



Elba Lucia Ramirez Garay

Licenciada em Ciência e Tecnologia na Produção de Alimentos

Avaliação da Bioacessibilidade de Compostos Antioxidantes de Plantas Aromáticas: Orégãos e Tomilho limão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
FCT/UNL

Co-Orientadora: Mestre Katelene Soraia Pereira Lima

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogais: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Junho, 2017



Elba Lucia Ramirez Garay

Licenciada em Ciência e Tecnologia na Produção de Alimentos

Avaliação da Bioacessibilidade de Compostos Antioxidantes de Plantas Aromáticas: Orégãos e Tomilho limão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
FCT/UNL

Co-Orientadora: Mestre Katelene Soraia Pereira Lima

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogais: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Junho, 2017

Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes de plantas aromáticas: Orégãos e Tomilho limão.

Copyright © Elba Lucia Ramirez Garay, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória a Deus e a minha Mãe...

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

A Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por me ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

A Professora Doutora Maria Paula Duarte pela orientação científica e dedicação que prestou ao trabalho desenvolvido.

Ao equipa de Fellow-Mundus pela bolsa e a oportunidade de estudar na Faculdade de Ciências e Tecnologia.

A Katelene Lima por toda a ajuda e colaboração ao longo deste trabalho.

Ao meu pai Francisco e meu irmão Fernando por todo o apoio, força e amor ao longo de estes dois anos, apesar da distância, e por terem sempre acreditado em mim.

Aos meus colegas, amigos e irmãos, Marcelo e Noelia por todo o apoio, ajuda, colaboração e por toda a diversão e os momentos inesquecíveis.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o de avaliar a bioacessibilidade de compostos antioxidantes e antimicrobianos de duas plantas aromáticas de consumo comum na cozinha tradicional portuguesa nomeadamente o orégano (*Origanum vulgare* L.) e o tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.). Para isso realizaram-se simulações *in vitro* do processo de digestão gástrica e gastrointestinal, avaliando a quantidade de fenóis e flavonóides totais bem como a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos através de cada um destes processos. Estes extratos permitiram avaliar a quantidade de compostos bioativos que se conseguiu solubilizar da matriz da planta ao longo do processo de digestão (fração bioacessível). Para ter uma ideia do potencial antioxidante e antimicrobiano destas plantas, os extratos obtidos por simulação do processo de digestivo foram sempre comparados com extratos preparados com etanol 70%, utilizando a mesma proporção massa de planta/volume de solvente.

A actividade antioxidante foi avaliada através de diferentes ensaios, nomeadamente avaliação da capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) e da espécie reactiva de oxigénio anião e anião superóxido (O₂^{•-}), e avaliação da capacidade redutora através dos ensaios FRAP (capacidade redutora férrica) e CUPRAC (capacidade redutora cúprica). A actividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da capacidade dos extratos para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Em relação à actividade antimicrobiana esta só se conseguiu detetar com os extratos etanólicos e apenas contra as bactérias Gram-positivas. Por outro lado, conseguiu detetar-se actividade antioxidante em todos os extratos, de ambas as plantas em estudo, e em todos os ensaios efectuados. Contudo, a actividade antioxidante após simulação da digestão gastrointestinal foi estatisticamente inferior à obtida nos extratos etanólicos. Esta diferença sugere que a simulação da digestão possa ter originado uma perda de compostos bioativos ou que, nas condições da digestão gastrointestinal, os compostos bioativos não tenham sido extraídos da matriz da planta. No entanto, apesar de ser inferior à dos extratos em etanol, a actividade antioxidante obtida após simulação da digestão sugere que tanto os orégãos como o tomilho limão ainda possam desempenhar um papel importante na defesa antioxidante, em particular atuando na desativação de espécies reativas de oxigénio que se possam formar no aparelho digestivo.

Palavras-chave: Plantas aromáticas, Bioacessibilidade, Actividade antioxidante, Actividade antibacteriana, Compostos fenólicos, digestão gastrointestinal, Orégãos, Tomilho limão.

Abstract

The work aimed to evaluate the bioaccessibility of antioxidant and antimicrobial compounds of two aromatic plants of common consumption in Portuguese traditional cuisine, namely oregano (*Origanum vulgare* L.) and lemon thyme (*Thymus x citriodorus* L.). For this purpose, *in vitro* simulations of gastric and gastrointestinal digestion were carried out, and the total phenolic and flavonoids contents as well as the antioxidant and antimicrobial capacity of the extracts obtained through each of these processes was assayed. Results obtained were compared with extracts prepared with 70% ethanol, using the same proportion of plant mass / volume of solvent.

The antioxidant activity was evaluated by different assays, namely the evaluation of the DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS^{•+} (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and superoxide anion (O₂^{•-}) scavenging assays and FRAP (ferric reductant-capacity) and CUPRAC (cupric reducing capacity) assays. Antibacterial activity was assayed against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*).

Antimicrobial activity was only detected with ethanolic extracts and only against the Gram-positive bacteria. In what concerns antioxidant activity results showed that all the extracts of both plants have antioxidant capacity in all the assays. However, the simulation of gastrointestinal digestion led to a loss of bioactive compounds since antioxidant activity was always statistically lower than the antioxidant activity of 70% ethanol extracts. Nevertheless, in spite of gastrointestinal digestion can not extract the full antioxidant potential of these plants, antioxidant activity detected suggests that both oregano and lemon thyme may still play an important role in antioxidant defense.

Keywords: Aromatic plants, Bioaccessibility, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Phenolic compounds, Gastrointestinal digestion, Oregano, Lemon-Thyme.

Índice

1. AS PLANTAS AROMÁTICAS, ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS.....	4
1.1. Caracterização das plantas aromáticas estudadas.....	6
1.1.1. Orégão.....	6
1.1.2. Tomilho limão	7
1.2. Atividades biológicas das plantas aromáticas	9
1.2.1. Atividade Antioxidante	9
1.2.2. Radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ROS).	10
1.2.3. Sistemas de defesa Antioxidante.	13
1.2.3.1. Compostos Fenólicos	16
1.3. Actividade Antimicrobiana	19
1.3.1. Plantas aromáticas, especiarias e extratos vegetais como Antimicrobianos.....	20
1.3.2. Mecanismos de ação de extratos de plantas aromáticas.....	22
1.3.3. Caracterização de algumas espécies bacterianas utilizadas para detetar atividade antimicrobiana	23
1.4. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade	24
1.4.1. Bioacessibilidade de compostos bioativos dos alimentos.....	26
1.4.2. Metodologias para avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Reagentes, enzimas e meios de cultura	29
2.2. Preparação das amostras de plantas aromáticas	29
2.2.1. Preparação dos extratos em etanol.....	30
2.2.2. Simulação <i>in vitro</i> da digestão gástrica	31
2.2.3. Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal	31
2.3. Determinação dos fenóis totais - Método Folin-Ciocalteu	32
2.4. Quantificação dos Flavonóides Totais.....	32
2.5. Determinação da actividade antioxidante.....	33
2.5.1. Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	33
2.5.2. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC.....	35
2.5.3. Avaliação da capacidade antioxidante através do ensaio de sequestro do radical DPPH'	36
2.5.4. Capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) - ABTS.	37

2.5.5. Determinação da actividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido.....	38
2.6. Determinação da actividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar 40	
2.7. Análise Estatística dos dados.....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1. Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteau	43
3.2. Quantificação dos Flavonóides Totais.....	44
3.3. Determinação da actividade antioxidante das diferentes plantas aromáticas. 46	
3.3.1. Sequestro do radical DPPH'	46
3.3.2. Determinação da actividade de redução do Fe (III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP 49	
3.3.3. Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC.....	50
3.3.4. Capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) - ABTS.	51
3.3.5. Determinação da actividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido.....	53
3.4. Determinação da actividade antimicrobiana das plantas aromáticas....	54
4. CONCLUSÃO	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

Índice de Figuras

Figura 1.1 Principais classes de fitoquímicos naturais	5
Figura 1.2 A - Flor de orégão; B - Planta de orégão	6
Figura 1.3 A - Planta de tomilho limão; B - Flor do tomilho limão	8
Figura 1.4 Principais causas, alvos e consequências da acção dos radicais livres no organismo humano.	11
Figura 1.5. Reacções de Fenton e de Haber-Weiss.....	12
Figura 1.6. Esquema da reacção mediada pela glutathione peroxidase.....	15
Figura 1.7 Estruturas de ácidos fenólicos.....	17
Figura 1.8 Principais estruturas de flavonóides.	18
Figura 1.9 Esquema da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	28
Figura 2.1 Aspeto dos orégãos utilizados neste estudo.	30
Figura 2.2 Aspeto do tomilho limão utilizado neste estudo.....	30
Figura 2.3 Formação do complexo (Fe ²⁺ -TPTZ) após redução do Fe ³⁺ por um antioxidante.....	34
Figura 2.4 Redução do complexo Cu(II) – neocuproína a Cu(I) – neocuproína, por acção dos antioxidantes da amostra	35
Figura 2.5 - Reacção de desativação do radical DPPH [•]	36
Figura 2.6 - Reacção de formação do radical catião ABTS.....	37
Figura 2.7 Redução do NBT ²⁺ (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B), que pode ser doseado espectrofotometricamente a 560 nm.	39
Figura 2.8 Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH.....	39

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Exemplos de agentes de defesa antioxidante	14
Tabela 1.2 Actividade antimicrobiana de produtos vegetais seleccionados.....	21
Tabela 1.3 Fatores que afetam a bioacessibilidade dos compostos bioativos.	27
Tabela 2.1 Composição do reagente FRAP	34
Tabela 3.1 Compostos fenólicos totais obtidos através dos extratos etanólicos e os extratos após a digestão gástrica e total dos orégãos e tomilho limão.....	43
Tabela 3.2 Teor em flavonóides totais nas amostras testadas.....	45
Tabela 3.3 Actividade antioxidante das amostras testadas por meio do teste de sequestro do radical DPPH•.....	47
Tabela 3.4 Actividade antioxidante das amostras em estudo por meio do teste FRAP.	49
Tabela 3.5 Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC.	50
Tabela 3.6 Actividade antioxidante equivalente ao Trolox pelo método ABTS•+ dos extratos.	51
Tabela 3.7 Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio sequestro do radical ânion Superóxido.	53
Tabela 3.8 Efeito inibitório dos extratos etanólicos de orégãos e de tomilho limão no crescimento das diferentes bactérias.....	54

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ABTS - 2,2'-azino-bis(3,etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ATP - Trifosfato de adenosina

CAT - Catalase

CUPRAC - **Cupric** Reducing antioxidant capacity

DPPH - radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

eq - Equivalente

FRAP - Ferric Reduction Antioxidant Power

GRAS - Geralmente reconhecido como seguro

GPX - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSH - Glutathione oxidada

GSR - Glutathione reductase

GST - Glutathione-S-transferase

HAT - Hydrogen atom transfer (transferência de um átomo de hidrogénio)

MHB - meio de cultura Mueller Hinton Broth

NADH - Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

nm - Nanómetro

OE - óleos essenciais

PMS - Metossulfato de fenazina

ROS - Espécies reactivas de oxigénio rpm – Rotações por minuto

SET - Single electron transfer (transferência de um electrão)

SOD - Superóxido dismutase

TEAC - Actividade antioxidante equivalente ao Trolox

TPTZ - Tripiridítriazina

Introdução

As plantas aromáticas têm sido usadas desde os tempos antigos para fins culinários como temperos nos alimentos, para conferir ou melhorar o seu aroma e sabor, bem como para ajudar a sua preservação. Da mesma forma, estas plantas têm sido aplicadas na cosmética e na medicina tradicional onde estão descritas como podendo auxiliar no tratamento de algumas doenças.

Numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as propriedades bioativas das plantas aromáticas, nomeadamente as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, bem como o de identificar os componentes destas plantas responsáveis por essas atividades. A função antioxidante de vários compostos bioativos nos alimentos tem atraído muita atenção devido ao papel que estes podem ter na prevenção de várias doenças crónico - degenerativas. Recentemente, foi afirmado que o efeito benéfico dos alimentos sobre a saúde humana pode relacionar-se com a actividade antioxidante de compostos bioativos contidos nestes produtos (GÜLÇİN, 2012).

Os compostos bioativos são definidos como componentes dos alimentos que influenciam a actividade fisiológica ou celular, resultando em um efeito benéfico para a saúde (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004). Estes compostos não são nutrientes porque não são essenciais para a vida e geralmente ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos. No entanto, diversos estudos epidemiológicos sugerem que os compostos bioativos contribuem para reduzir o risco de várias doenças (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

Para além do interesse que resulta do efeito benéfico que podem exercer sobre a saúde, as plantas aromáticas têm sido igualmente estudadas no sentido de avaliar a sua capacidade de preservar os alimentos, devido ao crescente interesse das indústrias alimentares em encontrar substitutos naturais para os aditivos sintéticos.

Os frutos e vegetais são considerados como as principais fontes alimentares de compostos bioativos, como vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides, que estão ligados à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como alguns tipos de cancro, muito devido às suas propriedades antioxidantes (DALY *et al.*, 2010; HARRISON & MAY, 2009; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

A oxidação é a transferência de eletrões de um átomo para outro e é uma parte normal da vida aeróbia. No entanto, este processo pode gerar radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio. Os radicais livres são continuamente produzidos durante eventos fisiológicos normais, mas são capazes de danificar biomoléculas importantes, como proteínas, lípidos ou o ácido desoxirribonucleico (DNA) (LIU, 2003).

Para lidar com estas espécies reativas de oxigénio, os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e enzimas capazes de reparar moléculas danificadas por radicais. Um antioxidante é uma molécula que, mesmo quando se encontra em pequenas quantidades, é capaz de inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas. Um alimento antioxidante é qualquer alimento rico neste tipo de compostos (GÜLÇİN, 2012).

As plantas aromáticas e especiarias são ricas em polifenóis, em particular flavonóides, terpenóides, e outros compostos voláteis. Muitos destes compostos possuem atividade antioxidante e/ou antimicrobiana (GULLUCE *et al.*, 2007). Os compostos antimicrobianos podem interferir com a integridade das membranas celulares inviabilizando assim a sobrevivência das células. Esta interferência pode ocorrer através da alteração da permeabilidade de membrana, permitindo assim a passagem de agentes nocivos para o interior da célula, ou podem afectar a síntese do peptidoglicano, contribuindo para a perda de rigidez da célula e alterando assim a sua forma. Estes compostos podem ainda inibir a síntese ácidos nucleicos, proteínas ou lípidos, ou inibir a atividade de diversas enzimas fundamentais para o funcionamento celular (CUSHNIE & LAMB, 2005). Os componentes antimicrobianos estão na sua maioria presentes no óleo essencial das folhas, flores, bolbos, rizomas ou frutos (LÓPEZ-MALO *et al.*, 2005).

As plantas aromáticas, especiarias e extratos vegetais são *produtos geralmente reconhecido como seguros* (GRAS) uma vez que, conforme anteriormente referido, são desde há muito tempo usados em alimentos para conferir sabor e ajudar na conservação (SHAN *et al.*, 2007; TIWARI *et al.*, 2009).

Diversos estudos mostram que os alimentos derivados de plantas são ricos em compostos bioativos. Contudo, grande parte desses estudos, baseia-se em ensaios *in vitro*, e, deste modo, levanta-se a questão de saber até que ponto é que as propriedades detectadas *in vitro* se mantêm *in vivo*. Com efeito, o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas. Para que isso aconteça é necessário que esse composto seja solubilizado da matriz do alimento durante a digestão gastrointestinal e que não seja degradado nesse processo ficando assim bioacessível. Em seguida é ainda necessário que esse composto seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inactivado pelas enzimas de biotransformação humana.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar se as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos orégãos e o tomilho limão, duas plantas aromáticas comumente utilizadas na cozinha tradicional Portuguesa, se mantinham após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. Para isso efetuou-se uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal e estudou-se o impacto deste procedimento na capacidade antioxidante e antimicrobiana bem como no teor em fenóis e flavonóides totais das duas plantas. Para poder ter uma melhor

noção da forma como a digestão vai alterando os compostos bioativos das plantas em estudo foram retiradas amostras após o processo de simulação da digestão gástrica e no final da simulação da digestão gastrointestinal.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Elaborar para cada uma das plantas aromáticas em estudo uma simulação da digestão gástrica, uma simulação da digestão gastrointestinal e um extrato em etanol 70% (atividade antioxidante total).
2. Quantificar os compostos fenólicos e, em particular, os flavonóides no extrato em etanol e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal.
3. Determinar a capacidade antioxidante no extrato em etanol e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal, de modo a conferir qual o impacto do processo digestivo nas propriedades bioativas das duas plantas. Não havendo nenhum método padrão validado que possa avaliar todos os possíveis mecanismos de atividade antioxidante, esta foi avaliada através da conjugação de diversos dos métodos existentes. Assim, na avaliação da capacidade antioxidante das plantas aromáticas recorreu-se a ensaios de avaliação da capacidade redutora (capacidade de redução do cobre e capacidade de redução do ferro) e capacidade de sequestro de espécies radicalares (sequestro dos radicais DPPH, ABTS e anião supeóxido).
4. Determinar a capacidade antimicrobiana do extrato em etanol das amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal contra bactérias gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*) e bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis*).

1. As plantas aromáticas, alimentos funcionais e nutracêuticos.

As plantas aromáticas têm sido usadas amplamente para preservar ou temperar diversos alimentos (MERCADO *et al.*, 2012). Estas plantas podem ser adicionadas de diferentes maneiras: com as folhas inteiras, moídas ou em forma de extrato. Por causa das propriedades aromatizantes que possuem, o uso directo destas plantas como antioxidantes é limitado pela possibilidade da sua adição alterar as propriedades organolépticas do produto sobre o qual estas são aplicadas (PEREZ TORTOSA, 2008). Muitas plantas aromáticas também têm sido usadas como plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças (MERCADO *et al.*, 2012).

As propriedades culinárias e o potencial terapêutico das plantas aromáticas têm sido atribuídas a vários componentes conhecidos como fitoquímicos bioativos (FOSTER *et al.*, 2005). Estas plantas podem assim ser encaradas como componentes da dieta, que para além de poderem fornecer nutrientes, contêm fitoquímicos bioativos que são benéficos para a saúde, podendo assim ser encaradas como alimentos funcionais (JONES, 2002).

Os alimentos funcionais são definidos como produtos alimentares de origem animal ou vegetal, consumidos na dieta diária que além de fornecer nutrientes possuem componentes bioativos. Estes compostos exercem efeitos farmacológicos que regulam as funções terapêuticas no corpo e que são benéficas para a saúde (ROBERFROID, 1999). Em alguns casos, estes componentes bioativos foram distribuídas comercialmente como nutracêuticos; os nutracêuticos são caracterizados por serem suplementos dietéticos bioativos benéficos para a saúde ingeridas em forma concentrada sob a forma de pílulas, comprimidos, cápsulas ou tónicos (JONES, 2002). Os alimentos funcionais de origem vegetal representam uma fonte potencial de fitoquímicos bioativos (Figura 1.1). Dentro dos fitoquímicos, os compostos polifenólicos têm sido extensivamente estudados pelo efeito contra doenças crónicas degenerativas que lhes são atribuídos, possivelmente devido à sua capacidade antioxidante (MERCADO *et al.*, 2012).

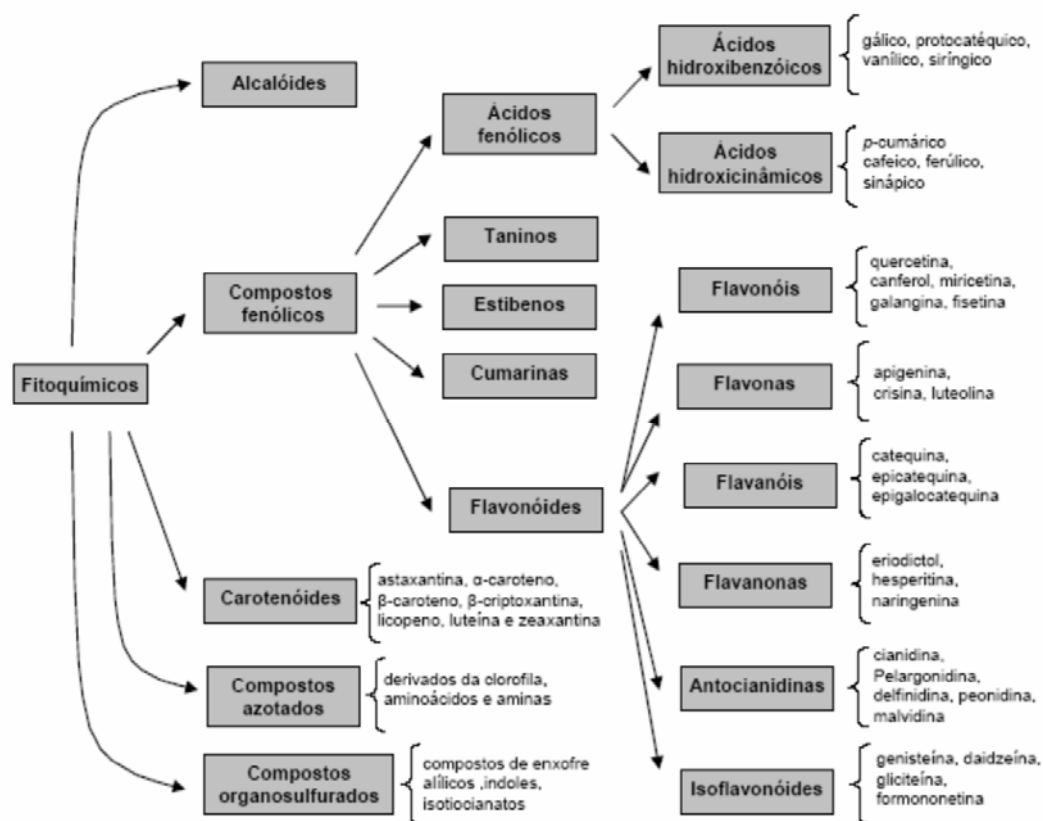


Figura 1-1 Principais classes de fitoquímicos naturais (FERREIRA & ABREU, 2007).

A procura contínua de fontes de antioxidantes naturais a fim de atender às preferências atuais dos consumidores, tem vindo a motivar um interesse crescente da indústria e muitos grupos de investigação científica para estudar espécies de plantas pertencentes à família botânica das Lamiáceas (tomilho, alecrim, salva, orégãos, etc.), devido às suas potentes propriedades antioxidantes e antimicrobianas que superam muito os antioxidantes naturais e sintéticos habitualmente utilizados (PEREZ TORTOSA, 2008).

1.1. Caracterização das plantas aromáticas estudadas.

1.1.1. Orégão

O nome orégãos inclui mais de duas dezenas de diferentes espécies de plantas, com flores e folhas apresentando um cheiro característico de "especiaria". Estas espécies são bastante utilizadas para fins culinários, sendo a mais comum o *Origanum vulgare*, nativa da Europa.

O *Origanum vulgare* L., pertence à família das Lamiáceas (*Lamiaceae*) e é uma planta que cresce espontaneamente em locais soalheiros e áridos até 2000 metros acima do nível do mar, sendo cultivada como planta aromática e por suas propriedades terapêuticas (Anon., 2017).

O caule é ereto, quadrangular, de 50-80 cm, ramificado e na parte superior é de cor avermelhado e coberto de uma espessa felpa. A raiz é um rizoma rastejante, enegrecido e com raízes fibrosas. As folhas são ovais-lanceoladas, de margens lisas ou ligeiramente denteadas, possuindo um pecíolo curto e, muitas vezes, pubescente. As flores estão encontradas no ápice dos caules e possuem cor branco-rosa-vermelho, com brácteas roxas. As flores são hermafroditas de polinização entomófila por abelhas e borboletas (Figura 1.2). O fruto é esférico e escuro (Anon., 2017).



A.



B.

Figura 1-2 A. Flor de orégão; B. Planta de orégão (A e B- <http://www.la-alpujarra.org/comun/plantas/labiadas.html>).

Entre os compostos que têm vindo a ser identificados nas espécies de *Origanum*, encontram-se o limoneno, β -cariofileno, o p-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno, carvacrol e o timol (LOARCA-PINA & GONZALEZ DE MEJIA, 2004).

Há diversos estudos sobre a composição química dos orégãos, utilizando extratos aquosos e seus óleos essenciais (PASCUAL *et al.*, 2001). Foram identificados flavonóides como a apigenina e a luteolina, álcoois alifáticos, compostos terpénicos e derivados do fenilpropano (JUSTESEN & KNUTHSEN, 2001). No *O. vulgare* foram encontrados os ácidos coumárico, rosmarínico, ferúlico, cafeico, hidroxibenzóico e vanílico (MILOS *et al.*, 2000).

Os monoterpenóides, compostos voláteis com odores intensamente pungentes, são os responsáveis pelas fragrâncias e sensações de cheiro-gosto de muitas plantas (DEWICK, 1997). Os principais quimiotipos da espécie *O. vulgare* são o carvacrol e o timol, cada um com enzimas específicas que dirigem a sua biossíntese (D'ANTUONO *et al.*, 2000).

O orégão (*Origanum vulgare*) tem demonstrado ter propriedades antioxidantes, antifúngicas, anti-espasmódicas e anti-sépticas. A acção potente dos seus princípios ativos, carvacrol e o timol parecem contribuir de forma determinante para o poder antibacteriano desta planta (TONGUINO, 2011).

As folhas de orégãos, para além de serem amplamente utilizadas na culinária, são ainda utilizadas no processamento de alimentos, no fabrico de cosméticos, produtos farmacêuticos e bebidas espirituosas (LOARCA-PINA & GONZALEZ DE MEJIA, 2004).

1.1.2. Tomilho limão

O tomilho pertence taxonomicamente à família das Lamiáceas (*Lamiaceae*), género *Thymus* (etimologicamente do latim "Thymún" e do grego "Thymon") e à classe das dicotiledóneas. O número de espécies listadas até agora excede os quinhentos, mas talvez sejam muitas mais as existentes por causa da grande facilidade desta planta aromática para produzir hibridações e mutações (PEREZ TORTOSA, 2008).

O tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.) é uma das Lamiáceas amplamente cultivadas na região do Mediterrâneo sendo utilizada há séculos na medicina tradicional e na culinária (PEREIRA *et al.*, 2013).

O tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.) é um híbrido entre o tomilho poejo (*Thymus pulegioides*) e o tomilho comum (*Thymus vulgaris*). Esta planta aromática (seu nome genérico vem do verbo grego *Thym*, referindo-se ao seu aroma intenso e agradável) é arborizada, de 10-40 cm de altura e muito ramificada. As folhas, de 3-8 mm, são lineares, oblongas, sentadas ou ligeiramente pedunculadas, opostas, tomentosas, sem cílios, e com as margens inferiores esbranquiçadas. As flores são axilares e estão agrupadas nas extremidades dos ramos, for-

mando uma secção terminal, por vezes com a inflorescência interrompida. As brácteas são verde-cinza, o cálice, minguate, com pêlos rígidos e com uma cor avermelhada. A corola é um pouco mais longa do que o cálice e tem cor branca ou rosa. Os quatro estames saem da corola e o fruto é um tetraquenio, de cor castanha (Figura 1.3) (LAGOS LA ROSA, 2012).

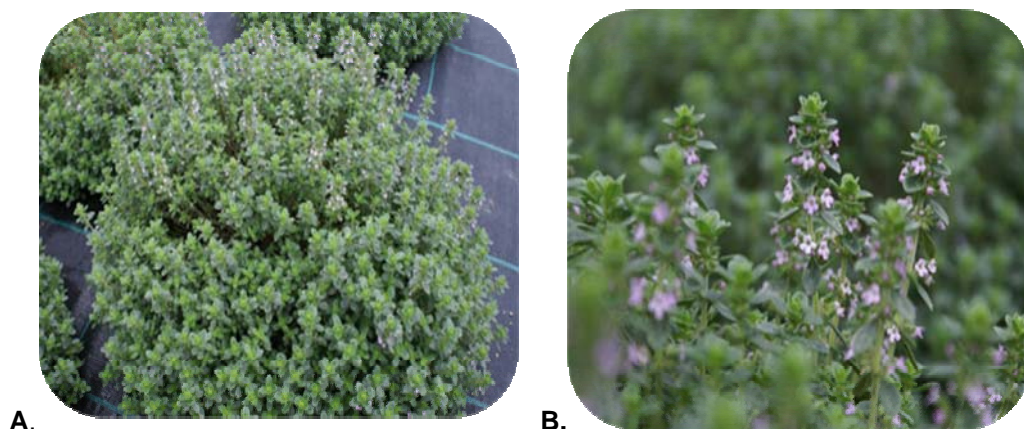


Figura 1-3 A. Planta de tomilho limão – B. Flor do tomilho limão (<http://cantinhodasaromaticas.blogspot.pt/2008/04/tomilho-limo.html?m=1>).

Diversos estudos efetuados com o tomilho têm permitido identificar alguns dos constituintes desta planta. Assim, foram identificados em extratos aquosos preparados a partir de plantas de secas ácido cafeico e seus oligómeros [ácido rosmarínico, ácido rosmarínico 3'-O-(8"-cafeoil), ácido litospermico e rosmarinato de metilo], flavonas (apigenina, luteolina, luteolina-7-O- β -glucuronido, luteolina-7-O-glucósido, glicosídeos de 6-hidroxiluteolina, crisoeriol e polimetoxiflavonas), flavanonas (naringenina, naringenina-7-O-glucósido, narirutina, eriodictiol, eriodictil-7-O-glucósido, isosacuranetina, eriocitrina e hesperidina), e o flavanonol taxifolina (DORMAN et al., 2004; FECKA & TUREK, 2008).

Num estudo realizado por PEREIRA e colaboradores (2013) o extrato de tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.) mostrou-se rico em ácido rosmarínico ($10,4 \pm 0,6$ mg/g de extrato) e em luteolina-7-O- α -glucuronido (12 ± 2 mg/g de extrato), que foi relatado em *Thymus* pela primeira vez.

O tomilho tem propriedades medicinais, como expectorante e antiespasmódico, anti-séptico, actividade anti-inflamatória e actividade antioxidante (LAGOS LA ROSA, 2012). O *Thymus x citriodorus*, ou tomilho de limão, é um dos tomilhos mais utilizados na culinária. A planta é usada como ingrediente para a confecção de várias receitas de entradas (recheados de queijo), lanches, molhos e diferentes carnes (recheio de carne), peixe ou pratos vegetarianos. Além disso, é usada na preparação de geleias e sobremesas (geleia de tomilho de limão), para con-

fecção de sopas e consumida em saladas frescas, bem como em marinadas para peixe grelhado, frango e pato assado, batatas e cenouras. Além do uso culinário o tomilho limão é também amplamente consumido na forma de infusão para fins medicinais (PEREIRA et al., 2013).

1.2. Atividades biológicas das plantas aromáticas

1.2.1. Atividade Antioxidante

Grande parte da atividade antioxidante associada com as plantas da família das Lamiáceas é devida à presença de compostos fenólicos. Por exemplo, desde há muito tempo que o alecrim e a sálvia são reconhecidos como sendo plantas com forte atividade antioxidante, contendo uma mistura de compostos fenólicos simples (tais como ácido rosmarínico e outros derivados do ácido cafeico) e de terpenos fenólicos (tais como o carnosol, ácido carnósico, rosmanol, etc.) cujo potente efeito antioxidante foi detetado em múltiplos ensaios *in vitro*. A presença destes mesmos compostos noutros membros da mesma família das Lamiáceas (orégãos, tomilho, poejo, etc.) faz com que essas espécies geralmente apresentam um grande interesse no ponto de vista da sua utilização em escala industrial (MADSEN & BERTELSEN, 1995).

Conforme anteriormente referido, um antioxidante é uma substância capaz de neutralizar a acção oxidante de radicais livres, libertando electrões que são capturados por estes radicais livres, e tem um papel preventivo no desenvolvimento de envelhecimento e certas doenças neurodegenerativas. O antioxidante, ao interagir com o radical livre confere-lhe um electrão, enfraquecendo a sua acção e, em alguns casos, tais como a vitamina E, podem regenerar a sua forma original por acção de outros antioxidantes (LOURDES *et al.*, 2001).

Os antioxidantes naturais presentes nas plantas têm despertado grande interesse nas últimas décadas, com o comprovar da existência de uma associação entre o estado de *stress* oxidativo e o desenvolvimento de um grande número de doenças oxidativo. Com efeito, diversos estudos têm vindo a demonstrar que os danos oxidativos causados pelos radicais livres estão associados com uma vasta gama de doenças e distúrbios, incluindo: insuficiência cardíaca, inflamação, cataratas, cancro, hipertensão, diabetes, doenças neurodegenerativas - Alzheimer e Parkinson e artrite reumatóide e ainda ao processo normal de envelhecimento (YOUNGSON, 2003; VALKO *et al.*, 2007).

O corpo humano mantém um balanço constante para preservar o equilíbrio entre a produção de pró-oxidantes, que são gerados como resultado do metabolismo celular, e os sistemas de defesa antioxidantes. A perda deste equilíbrio redox leva a um estado de *stress* oxidativo, que se caracteriza pelo aumento dos níveis de radicais livres e espécies reativas, que não é compensado por um aumento nos sistemas de defesa antioxidante. A condição de *stress* oxidativo pode originar uma acumulação de lesões oxidativas que podem conduzir a danos

e/ou morte celular (BECKMAN & AMES, 1998; GHADGE *et al.*, 1997; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999; RIVAS *et al.*, 2001; HARMAN, 1986).

A alteração do balanço entre os pró-oxidantes e os antioxidantes pode ter diversas magnitudes. No *stress* oxidativo leve as defesas antioxidantes são suficientes para restabelecer este equilíbrio, mas o *stress* oxidativo grave pode levar a alterações no metabolismo celular, quebra nas cadeias de DNA, aumento da concentração de cálcio intracelular, danos em proteínas específicas e peroxidação lipídica. Os danos causados pelo *stress* oxidativo podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo de fatores tais como a eficácia das defesas antioxidantes do organismo, a idade, o estado nutricional e fatores genéticos envolvendo os genes que codificam para os sistemas antioxidantes (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999).

A geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) e outros radicais livres (RL) no metabolismo celular aeróbio é um processo normal e necessário que geralmente é compensado pelos sistemas de defesa antioxidante endógenos, os quais ajudam a manter o equilíbrio redox (VALKO *et al.*, 2007). O desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode resultar de uma produção excessiva de ROS, ou do défice de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (VALKO, *et al.*, 2007).

Neste ponto, a dieta desempenha um papel importante na prevenção de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo, principalmente através do fornecimento de compostos bioativos de origem vegetal, que têm efeitos sinérgicos ou aditivos (Liu, 2004) que podem melhorar as defesas antioxidantes diretamente, ou indiretamente ativando e potenciando os sistemas antioxidantes endógenos (MASELLA *et al.*, 2005).

1.2.2. Radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ROS).

Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos que têm um electrão não emparelhado ou livre. Estas espécies são muito reativas, uma vez que tendem a captar um electrão das moléculas estáveis com o fim de alcançar a sua estabilidade. Quando o radical livre consegue subtrair o electrão que precisa, a molécula estável que o cedeu torna-se, por sua vez, um novo radical livre por ficar com um electrão não emparelhado, iniciando assim uma reacção em cadeia, que pode, eventualmente, originar a morte celular (AVELLO & SUWALSKY, 2006). A semi-vida biológica de um radical livre é de microssegundos, devido à sua capacidade para reagir com todas as moléculas ao seu redor, podendo, por isso, causar danos em células e tecidos (AVELLO & SUWALSKY, 2006).

Os radicais livres são produzidos de forma contínua no organismo por meio de reacções bioquímicas de oxido-redução (redox), os quais ocorrem no metabolismo normal das células, pelos fagócitos, numa reacção inflamatória controlada e também, por vezes, como resposta à exposição a radiação ionizante, radiação ultravioleta, a poluição ambiental, o fumo do cigarro

ou o exercício excessivo (CÉSPEDES & SÁNCHEZ, 2000). Os radicais livres em quantidades moderadas têm importantes efeitos fisiológicos, tais como a regulação da resposta imunológica de defesa (inativação de vírus, a remoção de bactérias ou fungos) (OLGUIN *et al.*, 2004). No entanto, quando se verifica um excesso de produção destas espécies, ou uma diminuição da capacidade de defesa, elas podem levar a lesões celulares que estão na base do desenvolvimento de diversas doenças (Figura 1.4).

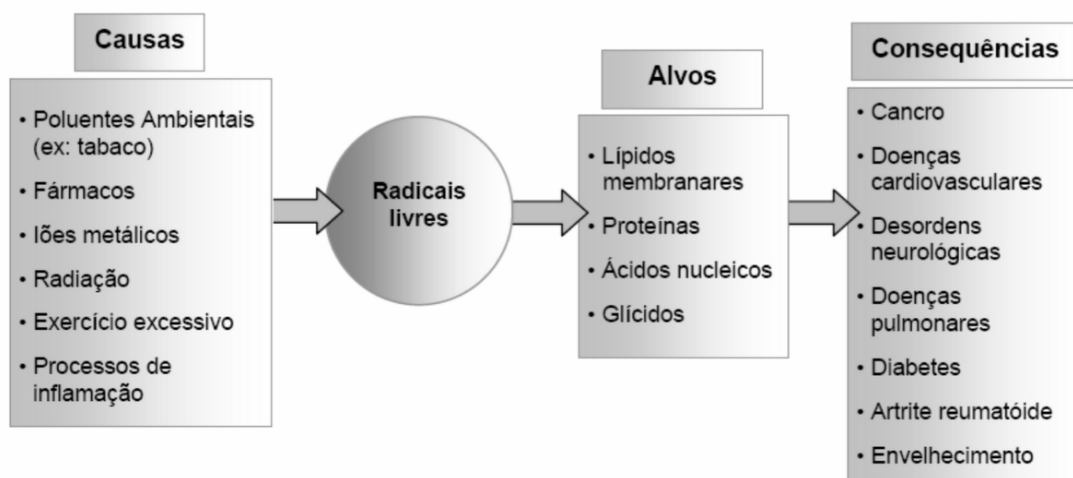


Figura 1.4. Principais causas, alvos e consequências da ação dos radicais livres no organismo humano (FERREIRA & ABREU, 2007).

Para controlar os níveis de espécies oxidativas os organismos aeróbios necessitam de ter sistemas de defesas antioxidantes. Estes sistemas incluem antioxidantes produzidos no corpo (antioxidantes endógenos) e antioxidantes obtidos a partir da dieta (antioxidantes exógenos). Os antioxidantes endógenos incluem as defesas enzimáticas, com as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase ou catalase. Os antioxidantes fornecidos pela dieta incluem, entre outros, vitaminas, essencialmente as vitaminas C e E, β -caroteno, licopeno e flavonóides (CÉSPEDES & SÁNCHEZ, 2000).

As espécies reativas de oxigénio (ROS) incluem espécies radicalares, como o radical anião superóxido ($O_2^{2\cdot-}$) ou o radical hidroxilo (OH^\cdot), e espécies não radicalares como, por exemplo, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o oxigénio singleto. Assim, nem todas as ROS são radicais de oxigénio (HALIWELL & CHIRICO, 1993; SORG, 2004; BUONCORE *et al.*, 2010).

O radical anião superóxido é considerada uma ROS primária, uma vez que ao reagir com outras moléculas pode gerar outras ROS, denominadas de ROS “secundárias”, podendo

ser um factor tanto oxidante como redutor, isto é, através da reacção de redução é produzido oxigénio molecular enquanto que pela reacção de oxidação ocorre a formação do peróxido de hidrogénio (BUONCORE *et al.*, 2010).

Nas células dos mamíferos a cadeia respiratória mitocondrial e a oxidação do hemo, que ocorre durante a ligação do oxigénio ao Fe(II) do hemo da desoxihemoglobina, constituem as duas principais vias de formação deste radical (BUONCORE *et al.*, 2010). O radical anião superóxido pode, igualmente, formar-se no decurso da actividade de outras enzimas, como, por exemplo, a xantina oxidase, as aldeído oxidase, os citocromos P450, ou a fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH)-oxidase em neutrófilos e macrófagos activados durante o processo inflamatório (PARKINSON, 1996; SORG, 2004; BUONCORE *et al.*, 2010), podendo ainda formar-se a partir do oxigénio molecular por acção de radiação ultravioleta ou ionizante (VALKO *et al.*, 2007).

O radical hidroxilo possui uma reactividade extremamente elevada, podendo danificar quase todas as moléculas presentes no corpo, sendo, deste modo, considerado um dos radicais mais perigosos (FESTY, 2007). Este radical pode formar-se a partir do radical anião superóxido e do peróxido de hidrogénio através das reacções de Fenton e de Haber-Weiss (VALKO *et al.*, 2007) (Figura 1.5).

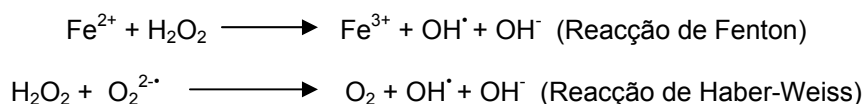


Figura 1.5 Reacções de Fenton e de Haber-Weiss (VALKO *et al.*, 2007).

Para além do Fe^{2+} outros iões metálicos, como o Cu^+ , Ti^{3+} ou o Co^{2+} , podem reagir com o peróxido de hidrogénio levando ao aparecimento do radical hidroxilo. Contudo a reacção de Fenton ocorre em maior escala quando o metal de transição é o ferro (BUONCORE *et al.*, 2010). Desta forma, a formação do radical hidroxilo *in vivo* está dependente da presença de Fe^{2+} livre e, portanto pode ser maior em portadores de condições fisiológicas que contribuam para uma maior disponibilidade deste ião, como é o caso dos doentes com hemocromatose ou β -talassémia (VALKO *et al.*, 2007). O radical hidroxilo pode ainda ser gerado através de uma série de outros mecanismos que incluem a decomposição da água através da radiação ionizante ou a decomposição fotolítica de alquilhidroxiperoxidos (BUONCORE *et al.*, 2010).

Outro radical de oxigénio com elevada relevância fisiológica é o radical peróxido (ROO^\bullet). A propagação das reacções de lipoperoxidação constitui a principal fonte de formação deste

radical. Além disso, a decomposição de peróxidos que pode ocorrer, quer por aquecimento, quer por catálise mediada por iões de metais de transição pode gerar a formação deste radical (HALLIWELL *et al.*, 1995).

O oxigénio molecular tem uma configuração electrónica única e é por si só um radical livre, uma vez que tem dois electrões desemparelhados. Contudo, devido às direcções paralelas de *spin* dos electrões desemparelhados, a sua reatividade é muito baixa. No entanto, a inversão de *spin* de um dos seus dois electrões desemparelhados, que pode ocorrer através de um *input* de energia, pode aumentar a reatividade desta molécula. Neste processo forma-se o oxigénio singlete, que é altamente reativo, podendo oxidar directamente proteínas, lípidos ou o DNA (BUONCORE *et al.*, 2010).

O peróxido de hidrogénio pode surgir *in vivo* como resultado da dismutação do radical anião superóxido, por acção da enzima superóxido dismutase, ou por acção de outras enzimas, como, por exemplo, os citocromos P450 (HALLIWELL *et al.*, 1995; PARKINSON, 1996). Também na actividade oxidativa dos peroxissomas se formam quantidades significativas deste composto (VALKO *et al.*, 2007). O peróxido de hidrogénio pode atravessar as membranas biológicas e embora possa causar danos de forma directa, através da sua capacidade oxidante, exerce-os principalmente de forma indirecta quando serve como fonte de outras espécies reactivas de oxigénio ainda mais deletérias, como é o caso do radical hidroxilo (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Para além de poderem ser produzidas no decurso dos processos metabólicos aeróbios as ROS podem ser produzidas a partir de fontes exógenas, com a exposição à radiação ionizante e não ionizante e a determinados contaminantes ambientais ou fármacos (PARKINSON, 1996; KOHEN & NYSKA, 2002; KLAUNIG *et al.*, 2001). A infecção por agentes patogénicos, tais como, bactérias ou vírus, pode, igualmente, resultar na produção de uma grande variedade de ROS através da libertação directa pelos invasores ou como resposta endógena induzida por fagócitos e neutrófilos (KLAUNIG *et al.*, 2001). Uma outra importante fonte de agentes oxidantes é a alimentação, uma vez que pode constituir um veículo de diferentes tipos de compostos oxidantes tais como peróxidos, aldeídos, ácidos gordos oxidados e metais de transição (KOHEN & NYSKA, 2002).

1.2.3. Sistemas de defesa Antioxidante.

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Essas defesas podem dividir-se em dois grandes grupos: os antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não-enzimáticos (Tabela 1.1) (SIES, 1993).

Tabela 1.1. Exemplos de agentes de defesa antioxidante (adaptado de SIES, 1993).

Exemplos de antioxidantes não enzimáticos	Enzimas antioxidantes
α -Tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase
β -Caroteno	Catalase
Ácido ascórbico (vitamina C)	Glutathione peroxidase
Polifenóis	NADPH-Quinona oxidoreductase
Proteínas do plasma	
Selénio	
Glutathione	
L-Cisteína	

Os antioxidantes enzimáticos são responsáveis pela defesa primária do organismo contra as ROS, impedindo a sua formação e interação com alvos celulares. Estas enzimas permitem manter níveis celulares baixos do radical anião superóxido e do peróxido de hidrogénio evitando assim a formação do radical hidroxilo. O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído por várias enzimas, sendo as principais a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (MATSUMOTO, 2008).

A SOD é essencial na defesa do organismo contra as ROS, na medida em que constitui a primeira etapa da defesa enzimática celular, controlando os níveis de $O_2^{\bullet-}$. A SOD é assim responsável por converter este radical em H_2O_2 e O_2 (FERREIRA & ABREU, 2007; AL-GUBORY *et al.*, 2010).

A CAT é uma hemoproteína localizada essencialmente nos peroxissomas, apesar de também estar vestigialmente presente na mitocôndria e no retículo endoplasmático. Esta enzima é responsável pela conversão do H_2O_2 em O_2 e água (SERAFINI, 2006; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A GPx pertence a uma família de enzimas que se divide em dois grupos: enzimas dependentes de selénio e enzimas independentes de selénio; sendo esta classificada como dependente de selénio. Esta enzima é responsável pela redução do H_2O_2 , bem como pela oxidação de outros hidroperóxidos, tais como, os hidroperóxidos lipídicos (ROOH), mediante a conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) (SERAFINI, 2006; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009; MATSUMOTO, 2008; AL-GUBORY, *et al.*, 2010) (Figura 1.6)



Figura 1.6. Esquema da reação mediada pela glutathiona peroxidase

A glutathiona redutase (GSR) é uma enzima antioxidante que catalisa a redução da GSSG a GSH, utilizando o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH) como agente redutor. Deste modo, a GSR é essencial ao ciclo de redução da glutathiona, mantendo-a em níveis adequados à manutenção do estado reduzido das células (AL-GUBORY *et al.*, 2010). Por sua vez, o NADPH é essencial para a actividade da GSR e para outras funções celulares importantes, sendo regenerado por acção da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na via metabólica das pentoses fosfato (AL-GUBORY *et al.*, 2010).

Os antioxidantes não enzimáticos atuam em diferentes níveis na protecção dos organismos. Assim, o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lípidos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos gordos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes não enzimáticos provêm maioritariamente da alimentação, sendo que as frutas e os vegetais são a sua principal fonte. Estes antioxidantes são essencialmente vitaminas, oligoelementos e polifenóis (MATSUMOTO, 2008; AL-GUBORY *et al.*, 2010). As vitaminas são essenciais ao organismo pois eliminam directamente as ROS. As principais vitaminas com acção antioxidante são a vitamina E, a vitamina C e o β -caroteno ou provitamina A.

A vitamina E é composta por quatro homólogos lipossolúveis; α -, β -, γ - e δ -tocoferóis. O homólogo mais activo e predominante é o α -tocoferol, sendo responsável pela protecção da membrana celular da oxidação por parte das ROS e radicais lipídicos, produzidos na peroxidação lipídica. Esta vitamina está presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas, bem como no fígado, rins e tecido adiposo e é o antioxidante lipossolúvel mais abundante (SERAFINI, 2006; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é uma vitamina antioxidante hidrossolúvel. Esta vitamina, para além de estar envolvida na desactivação directa de ROS, está, igualmente, envolvida na regeneração da forma activa de flavonóides e da glutathiona, de modo a que estes pos-

sam continuar a exercer as suas funções antioxidantes (MATSUMOTO, 2008; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis presentes em alimentos de origem vegetal, sendo responsáveis pelas suas colorações amarela, laranja e vermelha. Os carotenóides apresentam uma cadeia de carbono com ligações duplas, que os tornam compostos com potencial antioxidante, uma vez que as suas moléculas são capazes de receber electrões de espécies reactivas, neutralizando-as. Os principais carotenóides são o β -caroteno, luteína, α -caroteno, zeaxantina, criptoxantina e licopeno. O β -caroteno é o carotenóide mais abundante nos alimentos, sendo precursor da vitamina A e um excelente quelante do oxigénio singlete (SERAFINI, 2006; MATSUMOTO, 2008; AL-GUBORY *et al.*, 2010).

A glutatona (γ -glutamilcisteinilglicina) é um tripeptídeo e constitui o principal antioxidante não enzimático celular. Além de ser um co-factor para actividade da GPx, no seu estado reduzido, a glutatona, pode desactivar ROS e outras moléculas instáveis, quer por acção directa, quer através da enzima a glutatona-S-transferase (GST) (AL-GUBORY *et al.*, 2010).

Os oligoelementos são muito importantes, uma vez que integram o centro activo das enzimas antioxidantes e actuam como co-factores na regulação destas mesmas enzimas, sendo assim considerados antioxidantes indirectos. Estes elementos apenas são necessários ao organismo em quantidades mínimas para um metabolismo, desenvolvimento e fisiologia normal. Os principais oligoelementos com acção antioxidante indirecta são o cobre, o zinco, o manganésio e o selénio. Este último é particularmente importante, uma vez que protege os lípidos celulares de danos oxidativos (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

1.2.3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas e contribuem com a qualidade organoléptica dos alimentos em termos de cor, sabor e aroma (KARAKAYA, 2004). As principais fontes dietéticas de compostos fenólicos são os vegetais, mas também são encontrados em leguminosas, cereais, nozes, plantas medicinais e especiarias (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010). Os polifenóis podem ser classificados em diversas categorias que incluem os flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos (FERREIRA & ABREU, 2007), sendo que os compostos fenólicos mais abundantes na dieta são ácidos fenólicos e flavonóides (Figuras 1.7 e 1.8).

Os ácidos fenólicos podem ser classificados em duas classes: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos e podem ser encontrados nas plantas nas formas de ácidos fenólicos livres, ésteres, glicosídeos e/ou complexos ligados. Por outro lado, os flavonóides são um grupo de compostos fenólicos com características e estruturas químicas diversas. Estes compostos ocorrem naturalmente em frutos, vegetais, sementes e flores que são parte integrante da dieta

humana. Os flavonóides podem estar contidos nos alimentos principalmente como glucósidos embora alguns sejam encontrados como agliconas (forma livre). As classes mais importantes de flavonóides são: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis (catequinas), antocianidinas e isoflavonas (WEICHSELBAUM & BUTTRISS, 2010). As isoflavonas ocorrem quase exclusivamente em leguminosas, sendo a soja e produtos derivados da soja as fontes mais ricas desses compostos (LARKIN *et al.*, 2008). As isoflavonas são encontradas como glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina) ou agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína).

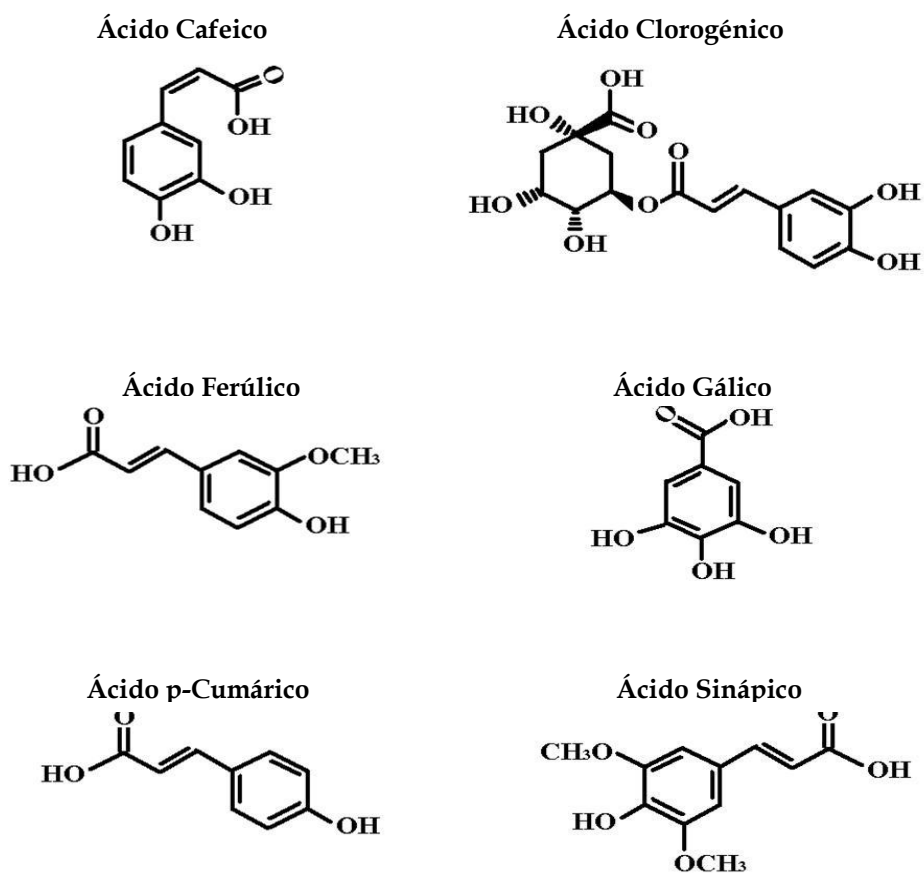


Figura 1.7. Estruturas de ácidos fenólicos (adaptado de LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008).

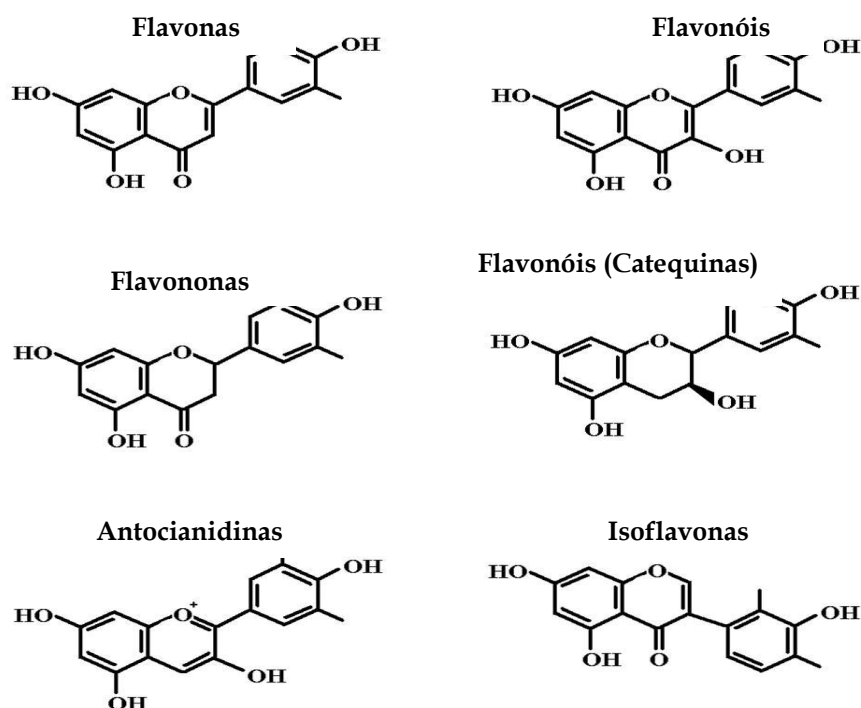


Figura 1.8. Principais estruturas de flavonóides (adaptado de KARAKAYA, 2004).

Como antioxidantes que são, os polifenóis podem proteger as células contra os danos oxidativos e, portanto, limitar o risco de várias doenças degenerativas associadas ao *stress* oxidativo, como as doenças cardiovasculares e o cancro (SERAFINI, 2006). Com efeito, estudos epidemiológicos mostraram que dietas ricas em compostos fenólicos podem inibir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inflamatórias, bem como alguns tipos de cancro (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Os polifenóis presentes nos alimentos podem ajudar a limitar esses danos através de vários mecanismos: sequestrando e inativando os radicais livres, estimulando sistemas endógenos de defesa (indução de enzimas de detoxificação, como a GST, que irão reforçar a excreção de pró-oxidantes, indução de enzimas antioxidantes, inibição das enzimas responsáveis pela geração de ROS, como, por exemplo, os citocromos P450 ou as lipoxigenases, inibição da produção de radicais hidroxilo pelas reacções de Fenton e Haber-Weiss através da quelação de iões metálicos (FERGUSON, 2001). Estes compostos podem ainda proteger e/ou regenerar outros compostos dietéticos, como, por exemplo, a vitamina E (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010).

As propriedades dos compostos fenólicos estão intimamente relacionadas com a sua estrutura e concentração. A sua estrutura determina as atividades antioxidantes e quelantes de metais. Além disso, quando presentes nos alimentos, os polifenóis podem agir como antioxidantes e proteger os alimentos da deterioração oxidativa (KARAKAYA, 2004). As isoflavonas

possuem propriedades hormonais e não hormonais que contribuem para a sua actividade biológica. Entre os atributos hormonais de isoflavonas estão o risco reduzido de doença cardíaca, osteoporose e afrontamentos em mulheres na menopausa (MESSINA *et al.*, 2004; NESTEL, 2003). As propriedades não hormonais foram associadas à actividade quimiopreventiva de ambos tipos de cancro, dependentes de hormonas e independentes de hormonas (MESSINA *et al.*, 2006; SARKAR & LI, 2003).

Diversos destes flavonóides têm sido caracterizados como detentores de várias actividades biológicas relevantes, que incluem actividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica, antioxidante antiestrogénica e antiproliferativa (COOK & SAMMAN, 1996; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; ROSS & KASUM, 2002). Os flavonóides em conjunto com outros antioxidantes, incluindo as vitaminas C e E, são capazes de inibir a peroxidação lipídica, causada pelas ROS, nas membranas celulares. Ao contrário das vitaminas C e E que estão concentradas nas fases aquosa ou lipídicas, respectivamente, os flavonóides conseguem abranger ambas as fases devido às suas características de solubilidade (ROSS & KASUM, 2002).

A inibição da peroxidação lipídica é considerada uma das mais importantes reacções associadas à capacidade antioxidante dos flavonóides. Normalmente os antioxidantes designados como antioxidantes de quebra de reacção em cadeia inibem ou retardam as reacções em cadeia da peroxidação lipídica ao interferirem na propagação da reacção em cadeia. Os flavonóides ao doar um átomo de hidrogénio ao ácido gordo ou ao radical ácido gordo, conseguem inibir a reacção na fase de iniciação (GALLEANO *et al.*, 2010).

A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus derivados depende do número e da posição dos grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, do sítio de ligação e da posição relativa dos grupos ligados e do tipo de substituintes (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Conforme anteriormente referido, existem dois principais grupos dentro dos ácidos fenólicos: o grupo dos ácidos hidroxibenzóicos e o grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, sendo estes últimos caracterizados como detentores de maior capacidade antioxidante do que os primeiros, devido à presença do grupo $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ que confere maior poder antioxidante que o grupo COOH presente nos ácidos hidroxibenzóicos. A presença de diferentes substituintes no esqueleto da estrutura fenólica tem também influência nas suas propriedades antioxidantes, em particular na sua capacidade de doação de átomos de hidrogénio (GÜLÇİN, 2012).

1.3. Actividade Antimicrobiana

Devido ao potencial antimicrobiano que apresentam, os extractos obtidos a partir de produtos vegetais têm sido apontados como alternativas promissoras aos conservantes sintéticos existentes (WALLACE, 2004). O potencial antimicrobiano destes extratos resulta do facto das

plantas serem ricas em uma variedade de compostos com atividade antimicrobiana tais como saponinas, taninos, alcalóides, alcenilfenóis, glicoalcalóides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas, terpenóides, e ésteres de forbol (LEWIS & AUSUBEL, 2006; TAJKARIMI *et al.*, 2010).

Foram publicados numerosos estudos sobre as propriedades antimicrobianas de metabolitos produzidos pelos produtos vegetais (BAJPAI *et al.*, 2008; TAJKARIMI *et al.*, 2010; TIWARI *et al.*, 2009). Dentro destes, os polifenóis, particularmente os flavonóides, têm demonstrado possuir atividade antibacteriana contra uma gama de microrganismos patogênicos (CUSHNIE & LAMB, 2005). Os óleos essenciais (OE) de especiarias e plantas aromáticas têm sido utilizados como conservantes de alimentos desde os tempos antigos (SHAN *et al.*, 2007). No entanto, nas últimas décadas há um interesse crescente em descobrir o efeito antimicrobiano exato destes OE. Várias revisões concentraram-se em relatos recentes do efeito antimicrobiano de especiarias e plantas aromáticas ou seus óleos essenciais contra bactérias patogênicas transmitidas pelos alimentos (BURT, 2004; DAVIDSON, 2001; HAYEK *et al.*, 2013; TAJKARIMI *et al.*, 2010; TIWARI *et al.*, 2009).

1.3.1. Plantas aromáticas, especiarias e extratos vegetais como Antimicrobianos.

As plantas aromáticas, especiarias e extratos vegetais são produtos GRAS que têm sido usados em alimentos devido ao sabor que lhes conferem e ao seu poder conservante (SHAN *et al.*, 2007; TIWARI *et al.*, 2009). Temperos como o cravinho, orégãos e alecrim são algumas das mais comuns especiarias e plantas com forte atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais obtidos destas especiarias contêm vários compostos ativos com atividade antimicrobiana tais como carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), cinamaldeído (3-fenilprop-2-enal), eugenol (4-alil-2-metoxifenol), e cânfora (WEERAKKODY *et al.*, 2010). As especiarias são ricas em compostos polifenólicos, flavonóides, terpenóides, e outros compostos voláteis como componentes antimicrobianos (GULLUCE *et al.*, 2007).

A Tabela 1.2 lista a actividade antimicrobiana de produtos vegetais seleccionados contra microorganismos patogênicos e contra microrganismos envolvidos nos processos deterioração dos alimentos.

Tabela 1.2. Atividade antimicrobiana de produtos vegetais selecionados.

Categorias	Produtos	Eficaz contra	Referências
Ervas e especiarias	Canela, cravinho, mostarda, pimenta da Jamaica, Coentro, cominho, orégãos, alecrim, sálvia, gengibre, açafrão	<i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	(CEYLAN & FUNG, 2004) (ZAIKA & KISSINGER, 1984)
	Sementes	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Campylobacter jejuni</i> .	(CEYLAN & FUNG, 2004) (PERUMALLA & HETTIARACHCHY, 2011) (KIM <i>et al.</i> , 2008).
Frutos	Romã, peras, framboesa, morango.	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i>	(HAYEK & IBRAHIM, 2012) (IBRAHIM, <i>et al.</i> , 2011) (PUUPPONEN-PIMIEA, <i>et al.</i> , 2001).
Vegetais	Pimentão, cebola, Brócolos, couve	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	(MAU, <i>et al.</i> , 2002) (CAREAGA, <i>et al.</i> , 2003) (AYAZ, <i>et al.</i> , 2008) (CORREIA, <i>et al.</i> , 2014)

ZAIKA (1988) agrupou diferentes especiarias com base na atividade antimicrobiana. Este autor definiu assim três diferentes grupos: Especiarias com atividade antimicrobiana forte (canela, cravinho, mostarda); Média (pimenta da Jamaica, louro, alcaravia, coentro, cominho, orégãos, alecrim, sálvia, tomilho); ou fraca (pimenta preta, pimenta vermelha, gengibre). A canela, o cravo-da-índia e a mostarda têm atividade antimicrobiana contra *Aspergillus spp.*, *Aspergillus parasiticus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* (LAI & ROY, 2004). O cominho, orégão, alecrim, sálvia e tomilho têm propriedades inibitórias contra *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. O extrato de alho tem atividade antibacteriana contra todos os sorotipos de *E. coli*, sendo a *E. coli* enterohemorrágica (sorotipo O157) e a *E. coli* enterotoxigênica (sorotipo O8) as são mais sensíveis ao extrato de alho (INDU *et al.*, 2006). O alho também mostrou efei-

tos inibitórios contra uma vasta gama de microorganismos incluindo *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia* (LAI & ROY, 2004).

1.3.2. Mecanismos de ação de extratos de plantas aromáticas.

O(s) mecanismo(s) exato(s) ou alvo(s) dos compostos antimicrobianos naturais são frequentemente desconhecidos ou não totalmente compreendidos. No entanto, diferentes modos de acção para diferentes grupos de agentes antimicrobianos foram revistos (DAVIDSON, 1997; GYAWALI & IBRAHIM, 2012; HOLLEY & PATEL, 2005). Assim, os compostos com atividade antimicrobiana podem interferir com a integridade da membrana plasmática podendo causar o vazamento do conteúdo celular. Estes compostos podem também causar uma redução direta do pH devido ao aumento da concentração de prótons, causando uma depressão do pH intracelular por ionização da molécula de ácido não dissociada, ou interrupção do transporte do substrato por alteração da permeabilidade da membrana celular (DAVIDSON, 1997; GONI *et al.*, 2009). Os ácidos orgânicos presentes nas espécies vegetais também podem inibir a oxidação do NADH, eliminando assim o fornecimento de agentes redutores aos sistemas de transporte de elétrons (DAVIDSON, 1997; RICKE, 2003).

Para além de poderem danificar a bicamada fosfolipídica da membrana celular, os compostos antimicrobianos das plantas podem interromper os sistemas enzimáticos celulares, comprometer o material genético de uma célula bacteriana ou formar hidroperóxidos de ácidos gordos por oxigenação de ácidos gordos insaturados (BURT, *et al.*, 2007). A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é em grande parte devida à capacidade desses compostos penetrarem na membrana celular de bactérias (DAVIDSON & NAIDU, 2000), causando danos na sua estrutura e permeabilidade, causarem alterações do pH intercelular, potencial de membrana e síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (SANCHEZ *et al.*, 2010). Outra possibilidade é a capacidade dos compostos fenólicos conseguirem afectar a síntese do peptidoglicano, contribuindo para a perda de rigidez da célula e alterando assim a sua forma. Diversos estudos têm identificado diferentes mecanismos através dos quais diversos compostos fenólicos podem exercer a sua atividade antimicrobiana. Estes mecanismos incluem a inibição da síntese de DNA, de RNA e ainda da síntese proteica e lipídica. (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Os compostos antimicrobianos das plantas podem agir de forma diferente para um grupo particular de microrganismos patogénicos alvo. Assim, o tipo de dano observado pode ser diferente entre bactérias mesmo quando tratadas com a mesma substância antimicrobiana (JUVEN *et al.*, 1994; SHIMAMURA *et al.*, 2007).

1.3.3. Caracterização de algumas espécies bacterianas utilizadas para detectar atividade antimicrobiana

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo, não esporulado, oxidase negativo, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa, capaz de fermentar a glucose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (ROBSON, 2002). A *Escherichia coli* é a espécie comensal predominante no microbiota anaeróbico facultativo do trato intestinal dos humanos e dos animais de sangue quente (DRASAR & HILL, 1974). Algumas estirpes de *E. coli* são patogénicas para o Homem e podem ser transmitidas através dos alimentos. A presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogénicos (ROBSON, 2002).

As estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam uma característica coloração verde brilhante, devido à produção dos pigmentos piocianina, de cor azul, e pioverdina, de cor amarelo fluorescente, os quais em conjunto dão esta coloração (FERREIRA & E.R.P., 2010). Esta bactéria é um bacilo muito versátil, Gram-negativo, oxidase positivo e pode crescer a temperaturas acima dos 42 °C. A *Pseudomonas aeruginosa* é um habitante comum das águas, solo e plantas. Nos hospitais pode ser encontrado em ventiladores, humidificadores, chuveiros, piscinas de hidroterapia e, ocasionalmente, nas mãos dos profissionais de saúde (FERREIRA & E.R.P., 2010; KERR & SNELLING, 2009). Esta bactéria é um agente patogénico oportunista responsável por uma ampla gama de infecções, especialmente hospitalares (BERTHELO *et al.*, 2005), sendo intrinsecamente resistentes a muitas classes de antibióticos que não têm nenhuma relação estrutural entre eles (STRATEVA & YORDANOV, 2009).

Os membros do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, de 0,5-1,5 micrómetros de diâmetro, que estão microscopicamente isolados, em pares, tétradas ou formam agregados irregulares. Estas bactérias são imóveis, anaeróbios facultativos, não formam esporos, geralmente são não capsuladas ou com limitada formação de cápsula. Os *S. aureus* são um agente etiológico de amplo espectro em infecções de origem comunitária (TODAR, 2008). Algumas das bactérias desta família costumam viver em contacto íntimo com o homem, numa relação de mutualismo, encontrando-se, frequentemente, em regiões da pele e nas áreas mais próximas dos orifícios naturais do corpo, estimando-se que cerca de 40% dos indivíduos saudáveis sejam portadores de *S. aureus* na nasofaringe, (Ferreira & Sousa, 2000). Quando esta bactéria encontra condições propícias, pode produzir toxinas, mais especificamente, enterotoxinas, que são o agente causador da intoxicação alimentar. Geralmente, a intoxicação é originada pela ingestão dessas toxinas, em alimentos contaminados, pela mesma, resultando em infeções que variam tanto na sua forma manifestação como na sua gravidade.

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (LOWY, 1998). Os antimicrobianos beta-lactâmicos ligam-se a proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), impedindo a formação da parede celular e resultando em lise bacteriana. O mecanismo de resistência à meticilina está relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. A codificação dessas novas PBPs, tornando esses microrganismos resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de (CHAMBERS, 1997).

Dentro dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) o *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente responsável pela infecção. Estes organismos estão entre as bactérias mais prevalentes da pele humana e da microflora da mucosa (O'GARA & HUMPHREYS, 2001).

Os *Enterococcus* são microorganismos cocos Gram-positivos que podem estar presentes como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. Os membros deste género são anaeróbios facultativos e catalase negativos. No entanto, as estirpes de *E. faecalis* são capazes de produzir uma pseudocatalase quando são cultivadas num meio de cultura que contém sangue, portanto é possível observar uma fraca efervescência. Além disso, os *Enterococcus* são capazes de crescer em condições extremas: meios com NaCl de 6,5%, pH 9,6 e uma vasta gama de temperaturas que vão desde os 10°C até aos 45°C (a temperatura óptima de crescimento é de 35°C) (FACKLAM & COLLINS, 1989). O reservatório natural destes microrganismos é o trato gastrointestinal dos mamíferos, mas pode ser detectada no solo, água ou alimentos (GIRÓN-GONZÁLEZ & PÉREZ-CANO, 2003). Os *Enterococcus* podem causar infecções do trato urinário, endocardite, meningite e infecções intra-abdominais (bilíares ou peritoneal), sendo uma das principais causas de infecções nosocomiais (LAUPLAND *et al.*, 2002).

1.4. Bioacessibilidade e Biodisponibilidade

Em farmacologia a biodisponibilidade refere-se à fracção de uma dose de medicamento a atingir a corrente sanguínea após a administração oral (SCHÜMANN *et al.*, 1994). Do ponto de vista nutricional, a biodisponibilidade indica a eficiência com que os nutrientes que se encontram num determinado alimentos ficam disponíveis para serem utilizados nas funções metabólicas. Assim, a biodisponibilidade depende da forma como decorrem os processos de digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes.

Diversos autores têm vindo a propor diferentes definições de biodisponibilidade de nutrientes que também se poderiam aplicar aos compostos bioativos, como, por exemplo, aos polifenóis.

Assim, a biodisponibilidade pode ser definida como a eficácia pela qual os nutrientes, numa forma química particular, são libertados da matriz dos alimentos na presença dos outros componentes da dieta, são absorvidos na mucosa intestinal e transportados para as células e órgãos, onde finalmente podem cumprir a sua função biológica (SCHELMMER, 1995). A biodisponibilidade pode também ser definida como a fracção do nutriente que é solubilizada e finalmente absorvida a partir do trato gastrointestinal e que atinge a circulação sistémica (CAUSSY, 2003) ou como a quantidade de cada nutriente que fica disponível durante a digestão gastrointestinal e é absorvida numa forma fisiologicamente útil (VAN CAMPEN & GLAHN, 1999).

A partir das definições acima expostas pode deduzir-se que o processo de biodisponibilidade é o resultado de três etapas (WATZKE, 1998):

1. Disponibilidade química ou física dos elementos/nutrientes no trato gastrointestinal, isto é, a fracção do nutriente ingerido que fica disponível para subsequente absorção, também chamada fracção bioacessível (RUBY *et al.*, 1999).
2. Absorção na mucosa intestinal e no estômago que pode envolver um processo de difusão passiva ou de transporte mediado por proteínas de membrana.
3. Transformação do elemento, na sua forma biologicamente ativa ou inativa.

São muitos os fatores que podem influenciar a biodisponibilidade dos compostos químicos. Alguns desses fatores são fisiológicos ou intrínsecos ao organismo e outros são dietéticos ou extrínsecos, sendo que os efeitos desses fatores podem ser cumulativos, aumentando assim a complexidade das interações (FAIRWEATHER-TAIT, 1996).

Os fatores intrínsecos incluem a variabilidade genética interindividual, idade ou etapa de desenvolvimento, estado fisiológico (gravidez, lactação, etc.), e nutricional, eventuais condições patológicas ou a composição da flora intestinal (microbioma intestinal). Os fatores extrínsecos incluem o aporte total pela dieta, a forma química em que o nutriente/elemento se encontra, a sua solubilidade e interação com os outros componentes da dieta que são ingeridos em simultâneo (BARBERÁ & FARRÉ, 1992).

No caso dos polifenóis a sua biodisponibilidade é determinada pela sua estrutura química, peso molecular, grau de polimerização, hidrofobicidade, solubilidade, pKa, glicosilação/acilação, matriz onde está inserido, outros componentes da dieta, bem como os fatores biológicos como trânsito gástrico e intestinal, o pH do lúmen, a permeabilidade da membrana e a excreção biliar (BRAVO, 1998; SCALBERT *et al.*, 2002; STAHL *et al.*, 2002). A grande varia-

bilidade deste grupo de compostos, assim como a presença nos alimentos de origem vegetal, de misturas complexas de compostos fenólicos dificultam os estudos da sua biodisponibilidade (BRAVO, 1998).

1.4.1. Bioacessibilidade de compostos bioativos dos alimentos.

Os alimentos derivados de plantas são fontes ricas de compostos bioativos. No entanto, tão importante como quantificar a quantidade total com que um determinado composto bioativo se encontra num dado alimento é avaliar a quantidade desse composto bioativo que fica bioacessível/biodisponível quando o alimento é ingerido. Com efeito, a biodisponibilidade, definida como a fração dos compostos bioativos que é digerida, absorvida e metabolizada através de vias normais, é um parâmetro essencial para determinar a quantidade de compostos ativos presentes nos alimentos que pode alcançar os locais relevantes do corpo em concentrações apropriadas e na forma ativa (REIN *et al.*, 2013; WOOD, 2005).

A fracção do composto bioativo libertada da matriz alimentar durante a digestão gastrointestinal e que fica solúvel no intestino para a absorção intestinal é normalmente conhecida como fracção bioacessível (FERRUZZI, 2010). Assim, a digestão gastrointestinal é a primeira etapa essencial que permite uma melhor compreensão da atividade biológica dos compostos bioativos contidos nos alimentos. Os compostos bioativos devem estar dispersos (isto é em solução aquosa), numa forma coloidal, ou num sistema micelar (para compostos hidrofóbicos) para que sejam bioacessíveis (DUCHATEAU & KLAFFKE, 2008). A bioacessibilidade depende de vários fatores relacionados com os compostos bioativos e com a matriz dos alimentos em que estes compostos se encontram (Tabela 1.3) (DUCHATEAU & KLAFFKE, 2008).

Tabela 1.3. Fatores que afetam a bioacessibilidade dos compostos bioativos (adaptado de DUCHATEAU & KLAFFKE, 2008).

Fatores relacionados com o composto bioativo	Hidrofobicidade/solubilidade em água
	Peso molecular
	Forma química em que se encontra
	Doador/aceitador de prótons
Fatores relacionados com a matriz do alimento	Composição química
	pH
	Estrutura
	Viscosidade

1.4.2. Metodologias para avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade

Diferentes metodologias, *in vivo* e *in vitro*, têm sido utilizadas para avaliar a biodisponibilidade e a bioacessibilidade de compostos bioativos a partir de alimentos, sendo que, todas estas metodologias, apresentaram vantagens e desvantagens.

Em geral, a biodisponibilidade de substâncias bioativas é avaliada através de estudos *in vivo* com seres humanos ou animais. Embora estudos *in vivo*, de intervenção humana forneçam informações mais específicas sobre a biodisponibilidade de compostos, estes são mais dispendiosos e difíceis de executar que os ensaios com animais. No entanto, os ensaios com animais têm como principal desvantagem as diferenças no metabolismo entre animais e humanos que podem dificultar a extrapolação dos resultados (WIENK *et al.*, 1999).

Como alternativa têm vindo a ser desenvolvidas metodologias *in vitro* que são uma abordagem mais rápida dos que estudos *in vivo* e são considerados ferramentas simples, baratas e reprodutíveis para avaliar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de diferentes constituintes alimentares (FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Uma dessas abordagens é a realização de uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal.

A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal é uma metodologia valiosa e útil para estimar os eventos pré-absorção como a estabilidade e a bioacessibilidade de nutrientes e compostos bioativos dos alimentos. Por esta razão, vários métodos *in vitro* de digestão gastrointestinal têm sido desenvolvidos. A maioria destes estudos foi revista por (HUR *et al.*, 2011). Esses autores pesquisaram mais de 80 modelos de digestão *in vitro* e relataram diferenças significativas no seu funcionamento: número e tipo de fases digestivas (isto é, boca, estômago, intestino delgado e intestino grosso), composição e concentração de fluidos digestivos (isto é,

enzimas, sais, tampões, polímeros biológicos e componentes de superfície activa) e o tempo de incubação das amostras em cada etapa digestiva. O tempo de digestão, a concentração e a composição das enzimas deve ser ajustado de acordo com as características da amostra.

Os alimentos são geralmente digeridos através de duas etapas *in vitro*: digestão gástrica e a digestão no intestino delgado (Figura 1.9) com a enzima pepsina e com uma mistura de enzimas pancreáticas (pancreatina) e bilis, respectivamente. Os passos iniciais da destruição dos alimentos são alcançados durante a digestão gástrica. As condições ácidas da digestão gástrica ajudam a quebrar a maioria das estruturas poliméricas e oligoméricas tais como proteínas e carboidratos (WOOD, 2005).

Durante a digestão intestinal ocorre um aumento significativo do pH, que altera a atividade das enzimas gástricas (DUCHATEAU & KLAFFKE, 2008). O fluxo biliar e a liberação de enzimas pancreáticas reduzem a tensão superficial intragástrica e, assim, facilitam a emulsão dos lípidos em micelas misturadas (FENNEL-EVANS & WENNERSTRÖM, 1994; KALANTZI *et al.*, 2006). A análise da fracção micelar proporciona uma ferramenta experimental para a análise de compostos lipossolúveis tais como carotenóides (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2012). Somente lípidos incorporados em micelas podem ser absorvidos pelas células intestinais em quantidades significativas (TREVASKIS *et al.*, 2008).

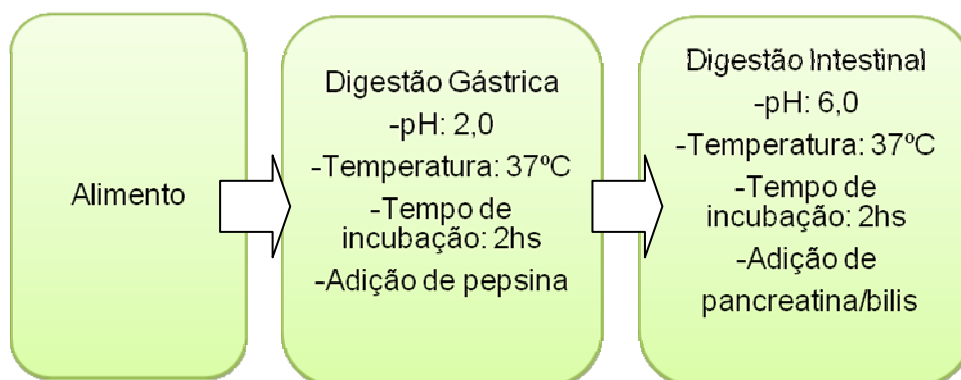


Figura 1.9. Esquema da digestão gastrointestinal *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes, enzimas e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes, enzimas e meios de cultura; 2,2'-azino-bis(3,etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) (Applichem Panreac), acetato de amónio (Fisher Scientific, 99,6%), ácido acético (Riedel-de Haën, 99,5%), ácido ascórbico (Fisher Chemical), ácido gálico (Alfa Aesar, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), álcool etílico (Sigma-Aldrich, 99,8%). Azul de nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, 98%), Bacteriological Agar Type E (Biokar diagnostics), bílis bovina desidratada (Fluka Analytical), carbonato de sódio (Applichem Panreac, 99,5%), (+)-catequina monohidratada (Aldrich, 96%), cloreto de alumínio (Panreac), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto férrico hexahidratado (José Manuel Gomes dos Santos, LDA, 99%), cloreto de sódio (Panreac, 99,5%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) (Aldrich), etanol (Sigma-Aldrich, 99,8%), fosfato de potássio dibásico (Merck, 99,5%), fosfato monopotássico (Panreac, 99%), hidróxido de sódio (José Manuel Gomes dos Santos, LDA, 98,5%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), Mueller Hinton Broth (BMH) (Biokar diagnostics), nitrito de sódio (Merck, 99%), (NADH) nicotiamida adenina dinucleotídeo (Amresco), neocuproína (Aldrich), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma), persulfato de potássio, reagente de Folin (Merck), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99%), trolox (Aldrich, 97%), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.2. Preparação das amostras de plantas aromáticas

Na realização deste trabalho foram estudadas duas plantas aromáticas: orégãos e tomilho limão. As amostras utilizadas foram adquiridas comercialmente numa superfície comercial.

As plantas foram lavadas com água corrente e deixadas a secar ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Depois de secas retiraram-se as raízes, os talos e as folhas secas e as folhas verdes foram cortadas finamente (Figura 2.1 e 2.2).



Figura 2.1. Aspeto dos oregão utilizados neste estudo.



Figura 2.2. Aspeto do tomilho limão utilizado neste estudo.

2.2.1. Preparação dos extratos em etanol

Para os extratos etanólicos pesaram-se as plantas aromáticas (oregão e tomilho limão) e adicionou-se etanol 70% (p/v) numa proporção de 20 g de amostra para 100 mL de solvente. As amostras foram homogeneizadas num Ultra-turrax (T18, IKA), e deixadas com agitação em agitadores em placa por 24 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Findo este tempo os extratos foram centrifugados durante 30 minutos, a 11000 g e a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e distribuído em tubos eppendorf estéreis (1,3 mL de extrato em cada tubo) sendo congelados até análise posterior. Estes extratos foram caracterizados em relação ao teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antioxidante (ensaio FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS e sequestro do radical anião superóxido) e atividade antimicrobiana.

2.2.2. Simulação *in vitro* da digestão gástrica

Para simulação da digestão gástrica seguiu-se um procedimento baseado no descrito por GIÃO *et al.* (2012). Assim, a 10 g das plantas cortadas (oregão e tomilho limão) adicionaram-se 50 mL de água, tendo-se ajustado o pH a 2,0 com HCl 1 M. Estas misturas foram totalmente homogenizadas num Ultra-turrax (T18, IKA), tendo-se posteriormente adicionado 50 µL de solução de pepsina (25 mg/mL em HCl 0,1 M) por cada mililitro de amostra. As amostras foram então incubadas numa incubadora orbital (Innova 4000 – Incubator Shaker), durante duas horas, ao abrigo da luz, com uma agitação de 100 rpm e à temperatura de 37 °C. No final da incubação as amostras foram centrifugadas (30 minutos a 11 000 g), tendo os sobrenadantes sido recolhidos, distribuídos em tubos eppendorf (1,3 mL de extrato em cada tubo) e armazenados a -20 °C. Estes extratos foram caracterizados em relação ao teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antiooxidante (ensaios FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS e sequestro do radical anião superóxido) e atividade antimicrobiana.

Paralelamente à digestão gástrica das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gástrica) em tudo idêntico ao procedimento anteriormente descrito mas em que não se adicionou nenhuma amostra.

2.2.3. Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

Para a simulação da digestão gastrointestinal seguiu-se um procedimento baseado no descrito por GIÃO *et al.* (2012). As amostras foram preparadas conforme o descrito no ponto anterior para a preparação da digestão gástrica. Após a incubação com pepsina, ajustou-se o pH das amostras a 6,0 recorrendo a uma solução de NaHCO₃ 1 M e adicionou-se 250 µL de uma solução mista de pancreatina e biliar bovina (2 mg/mL de pancreatina e 12 mg/mL de biliar em NaHCO₃ 0,1 M) por cada mililitro de amostra. As misturas foram novamente incubadas ao abrigo da luz, durante duas horas, com uma agitação de 45 rpm e à temperatura de 37 °C. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (11 000 rpm, durante 30 minutos), aliqüotadas em microtubos tipo Eppendorf (cerca de 1,3 mL de amostra por cada microtubo) e congeladas. Estes extratos foram caracterizados em relação ao teor em compostos fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antiooxidante (ensaios FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS e sequestro do radical anião superóxido) e atividade antimicrobiana.

Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gastrointestinal), em tudo idêntico ao procedimento anteriormente descrito mas em que não se adicionou nenhuma amostra.

2.3. Determinação dos fenóis totais - Método Folin-Ciocalteu

O ensaio de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação que ocorre entre os compostos fenólicos da amostra e o reagente de Folin-Ciocalteu, a pH básico, e que resulta na formação de uma intensa coloração azul susceptível de ser determinada espectrofotometricamente a 765 nm. O reagente de Folin-Ciocalteu contém uma mistura de tungstato de sódio e molibdato de sódio em ácido fosfórico e reage com os compostos fenólicos presentes na amostra. O ácido molibdotungstênio-fosfórico (formado pelos dois sais no meio ácido), de cor amarela, ao ser reduzido pelos compostos fenólicos, na forma de íon fenolato, origina um produto de coloração azul intensa, e essa intensidade é medida para avaliar o teor de polifenóis. A reação é uma reação redox, sendo que este ensaio também pode ser considerado como um método para medir a atividade antioxidante da amostra detetada através da sua atividade redutora. A oxidação dos polifenóis presentes na amostra, provoca o aparecimento de uma coloração azul que tem um máximo de absorção a 765 nm e é quantificada por espectrofotometria com base numa reta padrão de ácido gálico (GARCIA MARTINEZ *et al.*, 2015). Este método pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, tais como, açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre ou ácido ascórbico (PRIOR *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 1999).

O procedimento de determinação de compostos fenólicos totais utilizado foi adaptado a partir de um método já publicado por KOŞAR *et al.* (2008) com algumas modificações. Assim, em tubos de ensaios, contendo cerca 3 950 µL de água ultra-pura, adicionou-se 50 µL da amostra ou das suas diluições e 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente e adicionaram-se 750 µL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume). As amostras foram então incubadas durante duas horas, a 25°C e no escuro. Terminado este tempo foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul. Procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de extrato.

2.4. Quantificação dos Flavonóides Totais

A quantificação de flavonóides totais foi efetuada utilizando o método de complexação com o alumínio na presença de nitrito. Esta determinação baseia-se no facto de, em meio bási-

co, ocorrer a formação de complexos estáveis entre o alumínio e os flavonóides que na presença de nitrito apresentam uma coloração rosa salmão que absorve a 510 nm (CRUZ GALLEGOS, 2012).

O teor em flavonóides foi analisado de acordo com o método descrito por BARROS *et al.* (2010). Assim, em tubos de ensaio adicionaram-se as amostras (ou as suas diluições) e água ultra-pura até completar um volume de 2 mL. Em seguida adicionaram-se 150 µL de uma solução de NaNO₂ (5% p/v), agitou-se no vortex e deixou-se seis minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se então 150 µL de uma solução de AlCl₃ (10% p/v), agitou-se novamente no vortex e deixou-se outros seis minutos à temperatura ambiente. Por último adicionaram-se 2 mL de NaOH (4% p/v) e incubaram-se todos os tubos no escuro durante 15 minutos. Terminado este tempo foi possível observar o aparecimento de uma coloração rosa salmão. Procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 510 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em flavonóides totais sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de catequina com concentrações entre os 1 mM e os 0,015625 mM. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina por litro de extrato.

2.5. Determinação da actividade antioxidante

2.5.1. Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

O ensaio FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*) determina a capacidade antioxidante da amostra através da determinação do seu poder redutor. Neste ensaio é avaliada a capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II). Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditiazina (Fe³⁺-TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, de forma a manter a solubilidade do ferro, uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm (MAGALHÃES, 2008) (Figura 2.3)

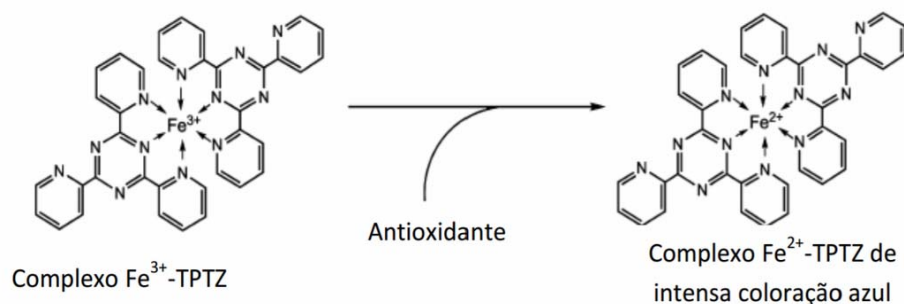


Figura 2.3. Formação do complexo (Fe^{2+} -TPTZ) após redução do Fe^{3+} por um antioxidante (adaptado de PRIOR *et al.*, 2005).

Este método, embora rápido, simples e robusto, apresenta algumas limitações como o facto de qualquer composto que possua potencial redox superior ao do par Fe(III)/Fe(II) ser capaz de reduzir o complexo férrico, mesmo que não possua atividade antioxidante. Por outro lado, este método não permite detetar antioxidantes cujo mecanismo de ação seja exclusivamente a transferência de átomos de hidrogénio (MAGALHÃES, 2008). A existência na amostra de compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda pode interferir na determinação, causando medições incorretas no valor FRAP (SUBTIL *et al.*, 2009).

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por BENZIE & STRAIN (1996) com as modificações de RAMFUL *et al.* (2010). Assim, num tubo de ensaio adicionou-se 100 (ou 100-x) μL de cada uma das amostras ou de suas diluições, com 300 (ou 300+x) μL de água e 3 mL de reagente FRAP (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Composição do reagente FRAP (RAMFUL *et al.*, 2010).

Reagentes	Quantidade
Tampão acetato 0,25 M pH 3,6	25 mL
TPTZ 10 Mm em HCl 40 Mm	2,5 mL
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 Mm	2,5 mL

Os tubos foram incubados quatro minutos a 37°C . Durante esta incubação foi possível visualizar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} /litro de extrato.

2.5.2. Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC.

O método CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por acção de antioxidantes redutores presentes numa amostra. A forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm. Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Figura 2.4) (APAK *et al.*, 2004).

O complexo Cu(II)-neocuproína é estável e responde tanto a antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (BEKTAŞOĞLU *et al.*, 2006). Os prótons libertados na reacção entre os polifenóis e este complexo, são tamponados por uma solução de acetato de amónio (APAK *et al.*, 2004). Embora os iões Cu^{2+} estejam estequiometricamente em excesso em relação à neocuproína, o agente oxidante é o complexo Cu(II)-neocuproína e não o ião Cu^{2+} , uma vez que o potencial padrão de redução do par Cu(II/I)-neocuproína (0,60 V) é muito superior ao do par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (0,17 V). Em resultado, os polifenóis são oxidados muito mais rapidamente e eficientemente com complexo do que com Cu^{2+} , e a quantidade do complexo Cu(I)-neocuproína que surge no final da reacção redox é equivalente à do reagente Cu(II)-neocuproína (APAK *et al.*, 2007).

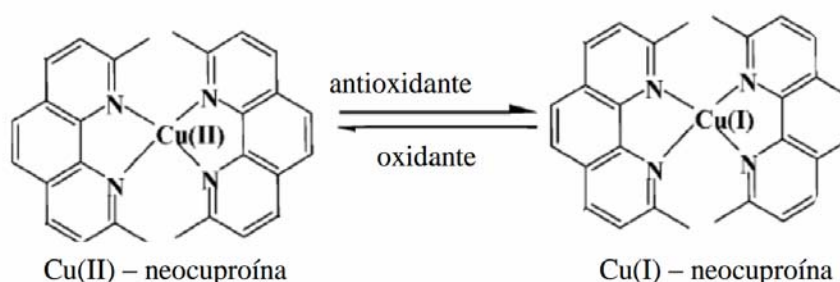


Figura 2.4. Redução do complexo Cu(II)-neocuproína a Cu(I)-neocuproína, por acção dos antioxidantes da amostra (adaptado de Apak *et al.*, 2004).

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por (APAK *et al.*, 2004) com algumas adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1 M, neocuproína 7,5 mM em etanol 96%. Em seguida, adicionou-se a amostra ou suas diluições (volumes entre 50 e 100 μ L), e completou-se a 4100 μ L com água. Os tubos foram incubados durante uma hora à temperatura ambiente, procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra. As amostras foram analisadas em triplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico, com concentrações entre os 0 e os 250 μ M. Os resultados foram expressos em μ mol equivalentes de ácido ascórbico/litro de extrato.

2.5.3. Avaliação da capacidade antioxidante através do ensaio de sequestro do radical DPPH[•]

Neste ensaio, é avaliada a capacidade de um potencial antioxidante para neutralizar um radical (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) tem uma cor púrpura apresentando um máximo de absorção a 517 nm. Ao aceitar um átomo de hidrogénio de um antioxidante, ou ao ser reduzido, o radical vai desaparecendo, dando lugar à hidrazina correspondente, passando a cor de púrpura para amarelo. Desta forma, a actividade antioxidante pode ser determinada através da avaliação da diminuição da absorção do DPPH[•] a 517 nm (FOTI *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2008; MATSUKAWA *et al.*, 1997; MICELLI *et al.*, 2009; MOON & SHIBAMOTO, 2009).

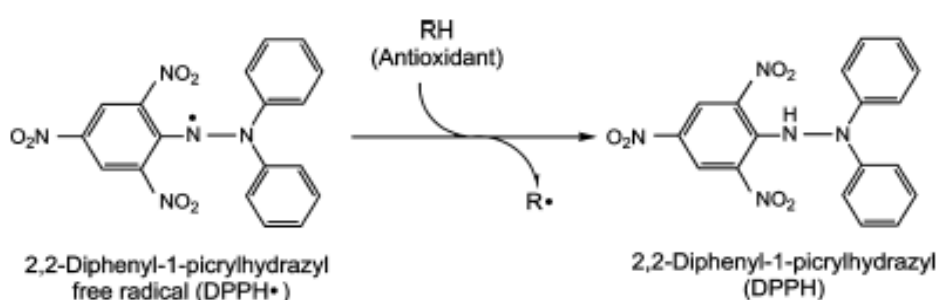


Figura 2.5 - Reação de desativação do radical DPPH[•] (MOON & SHIBAMOTO, 2009).

O DPPH é um radical azotado de vida longa, que não está relacionado com os radicais de oxigénio altamente reativos envolvidos na peroxidação lipídica. Muitos antioxidantes que

reagem rapidamente com os radicais peróxido podem reagir lentamente ou, ainda mais, podem ser inertes face ao DPPH (HAUNG *et al.*, 2005). Apesar desta desvantagem, o ensaio do DPPH ainda é uma técnica amplamente utilizada devido à sua simplicidade e a vantagem de utilizar um radical livre estável e disponível comercialmente. Esta técnica é altamente reproduzível e comparável com outros métodos tais como o ABTS, a redução do anião superóxido e a inibição da peroxidação lipídica (VILLANO *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante através do ensaio do DPPH foi analisada de acordo com o método adaptado por MICELLI *et al.* (2009). Assim em tubos de ensaio, misturaram-se 500 µL de cada uma das amostras, ou de suas diluições, com 3 mL de uma solução de DPPH• (24 mg/L em etanol). As diversas misturas foram agitadas, tendo-se medido a absorvância a 517 nm (espectrofotômetro SPEKOL 1500) após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo para cada amostra sido determinada a percentagem de sequestro através da equação:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância sem amostra} - \text{Absorvância com amostra}) / (\text{Absorvância sem amostra})] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical DPPH• das amostras determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido ascórbico com concentrações entre os 0,14 mg/mL e os 0,004375 mg/mL. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido ascórbico/litro de extrato.

2.5.4. Capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) - ABTS.

Este ensaio mede a capacidade dos antioxidantes em estudo para sequestrar o radical catião 2,2'-azino-bis(3,etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) quando comparados com uma quantidade determinada do antioxidante sintético Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E). O radical ABTS^{•+} é formado por reacção entre o ABTS e o persulfato de potássio (Figura 2.6).

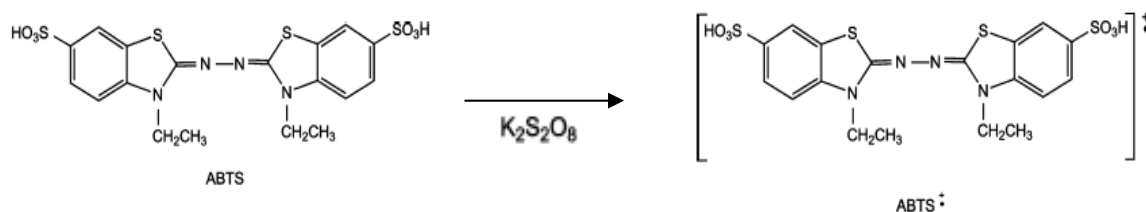


Figura 2.6 - Reação de formação do radical catião ABTS.

A adição de antioxidantes reduz a concentração do radical verde/azulado $\text{ABTS}^{\bullet+}$ numa extensão que é dependente da capacidade e da concentração do antioxidante, bem como, do tempo de reacção. Desta forma, a determinação da percentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para um determinado antioxidante, avaliada pela diminuição da intensidade da cor, é calculada em função da concentração e do tempo e comparada com a capacidade de inibição do Trolox exactamente nas mesmas condições.

Na presença de antioxidantes doadores de hidrogénio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria. Este radical reage de forma enérgica com os compostos doadores de hidrogénio, como os compostos fenólicos, sendo convertido numa forma não colorida de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (BORGES *et al.*, 2011). Como vantagem tem a sua relativa simplicidade, que permite a sua aplicação na rotina de qualquer laboratório. Divergências nos resultados podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (BORGES *et al.*, 2011).

A realização do ensaio ABTS foi efetuada de acordo com o método descrito por RE *et al.* (1999) com algumas adaptações. A solução do radical catião $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi obtida juntando igual volume de uma solução de ABTS 7 mM e de persulfato de potássio 4,9 mM. Esta solução foi incubada no escuro e à temperatura ambiente, durante 16 horas. Para determinar a capacidade de sequestro do radical ABTS, adicionou-se, num tubo de ensaio, a amostra ou suas diluições e completou-se o volume até 600 μL com etanol. Em seguida, juntaram-se 3 500 μL da solução diluída de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a cada um dos tubos e agitou-se vigorosamente. As misturas foram incubadas durante seis minutos à temperatura ambiente, procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 734 nm, utilizando um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por etanol.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a percentagem de inibição calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância sem amostra} - \text{Absorvância com amostra}) / (\text{Absorvância sem amostra})] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical ABTS das amostras foi determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de Trolox com concentrações entre os 0 e os 160 μM . Os resultados obtidos foram expressos em μmol equivalentes de Trolox/litro de extrato.

2.5.5. Determinação da actividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido.

O radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), à temperatura ambiente, reduz o azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}), originando o azul formazano (Figura 2.7). A geração do formazano é acompanhada

pelo aparecimento de uma coloração púrpura que apresenta um máximo de absorção a 560 nm (VALENTÃO *et al.*, 2001; GÜLÇİN, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2010). Desta forma, se à mistura de reação se adicionar um composto com capacidade para captar o $O_2^{\bullet-}$, passam a existir, no meio reacional, dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT^{2+} , com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (VALENTÃO *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2008).

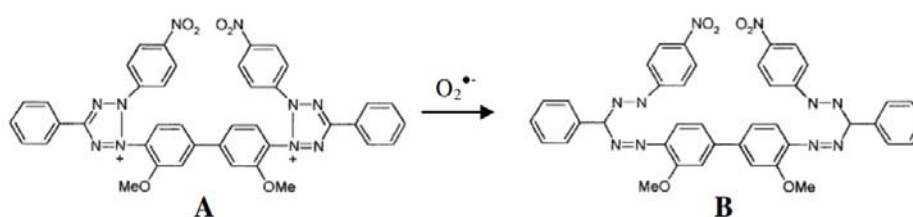


Figura 2.7. Redução do NBT^{2+} (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B), que pode ser doseado espectrofotometricamente a 560 nm.

Em condições aeróbias, o radical anião superóxido pode ser gerado utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em que, o PMS após ser reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio produzindo o radical anião superóxido (Figura 2.8) (NAKAMURA *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

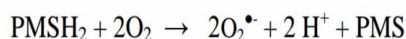
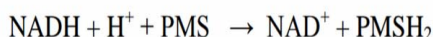


Figura 2.8. Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (NAKAMURA, *et al.*, 1992).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por ROYER *et al.* (2011). Num tubo de ensaio adicionou-se a 1 mL da diluição apropriada da amostra em estudo, 1 mL de NADH 0,48 mM, 1 mL de NBT^{2+} 100

μM e, por último, para iniciar a reação adicionou-se 100 μL de PMS 60 μM. As amostras foram então incubadas em estufa a 30 °C, durante 15 minutos tendo no final a absorvância (espectrofotômetro SPEKOL 1500) sido medida a 560 nm. As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma descrita para as amostras mas substituindo a amostra por soluções de ácido gálico, tendo a reta sido efetuada com concentrações entre 0 e os 73 μM

Todas as amostras foram analisadas em triplicado tendo a percentagem de inibição da formação do azul de formazano sido avaliada através da expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância sem amostra} - \text{Absorvância com amostra}) / (\text{Absorvância sem amostra})] \times 100$$

Os resultados foram expressos em μmol equivalente de ácido gálico por litro de extrato.

2.6. Determinação da actividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar

O método de difusão em ágar baseia-se no (Método de Kirby-Bauer originalmente descrito por Bauer *et al.* Este método de difusão em disco ou em poço foi padronizado e é actualmente recomendado pelo Subcomitê de Ensaio de Susceptibilidade de NCCLS, dos Estados Unidos da América. O fundamento desta determinação é estabelecer o efeito de um conjunto de substâncias, testadas individualmente, em estirpes bacterianas isoladas (Comitê "l'Antibiogramme de la Societe" Franc, 1996; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997). O método de difusão em ágar, é suportado por dados clínicos e laboratoriais; e tem a vantagem de os resultados serem altamente reprodutíveis (BARRY *et al.*, 1979).

O método de difusão em agar baseia-se na avaliação da concentração da substância necessária para inibir uma estirpe bacteriana, que se determina medindo o halo de inibição de crescimento na superfície de uma placa de agar com um meio de cultura adequado e inoculadas de forma homogênea com a bactéria em estudo e no qual são depositados de forma equidistante discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados com uma quantidade conhecida da substância, ou são efetuados poços equidistantes onde posteriormente se coloca um volume conhecido de amostra (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998; HACEK *et al.*, 1999; MBATA, *et al.*, 2006). Quando a amostra é colocada directamente no poço maior é a sensibilidade detectada em comparação com a aplicação de discos de papel (VALGAS *et al.*, 2007). Após aplicação das amostras as placas devem ser colocadas em refrigeração, a 4 °C, para permitir a difusão total dos extratos antes de se iniciar a incubação das bactérias em estufa (TEPE *et al.*, 2004).

É necessário assinalar que o tamanho da zona de inibição (halo) é influenciada por vários fatores, incluindo o meio de cultura em que é feito o teste, a capacidade de difusão do

composto, a quantidade e concentração de inóculo e o tempo de incubação. Qualquer variação destes factores pode afectar o resultado do teste, no entanto, usando um procedimento padrão, é possível obter resultados fiáveis (RAMIREZ & MARIN-CASTAÑO, 2009).

Neste estudo a actividade antimicrobiana dos orégãos e do tomilho limão foi avaliada contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC1228), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC33591)) e bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027)). Todos os microrganismos utilizados neste estudo foram cedidos pela empresa Elisa Câmara SA.

A suspensão dos microrganismos para os ensaios foi preparada transferindo-se diversas colónias, com crescimento entre 18-24 horas, bem isoladas, do meio Muller Hinton Agar (meio Muller Hinton com agar 1,5%) para um tubo contendo 10 mL de meio salino (0,85 % NaCl). A turbidez da solução foi ajustada a 0,5 na escala McFarland (densitometro Grant DEN-1B). As suspensões assim preparadas foram inoculadas com auxílio de uma zaragatoa na superfície de placas de Petri contendo meio Muller Hinton Agar. De seguida, efectuaram-se poços equidistantes de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um tubo de vidro estéril, tendo as diversas amostras sido introduzidas nesses poços (50 µL por poço). As placas foram depois colocadas a 4 °C para difusão completa dos extractos e, em seguida, foram a incubar em estufa a 37 °C durante 24 horas. Foram realizados triplicados de todas as amostras e foram sempre efetuados ensaios controlo com os diversos solventes das amostras. Após o tempo de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos com uma régua tendo a atividade antimicrobiana sido estimada a partir do diâmetro dessas zonas de inibição.

2.7. Análise Estatística dos dados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado recorrendo ao *software* Microsoft Office Excel 2010® (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05, sendo que se $P < 0,05$ existem diferenças significativas entre as amostras.

3. Resultados e Discussão

O conhecimento dos níveis de ingestão de polifenóis na dieta e sua bioacessibilidade/biodisponibilidade ao longo do tracto gastrointestinal são fatores chave para avaliar a significância biológica na saúde humana. Pretendeu-se com este trabalho avaliar a bioacessibilidade dos antioxidantes de duas plantas aromáticas amplamente utilizada na cozinha tradicional portuguesa: os orégãos e o tomilho limão. Para cumprir este objetivo realizaram-se simulações *in vitro* do processo de digestão gástrica e gastrointestinal, avaliando a quantidade de fenóis totais, de flavonóides totais e a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos através de cada um destes processos. Estes extratos permitem avaliar a quantidade de compostos bioativos que se consegue solubilizar da matriz da planta ao longo do processo de digestão (fração bioacessível).

Para ter uma ideia do potencial antioxidante e antimicrobiano destas plantas, os extratos obtidos por simulação do processo de digestivo foram sempre comparados com extratos preparados com etanol 70%, utilizando a mesma proporção massa de planta/volume de solvente. A utilização deste solvente baseou-se em resultados publicados que mostram a sua eficiência na extração dos compostos bioativos destas plantas. HAMDY e colaboradores (2012) analisaram a actividade antioxidante e os compostos fenólicos em extratos de tomilho, sálvia e manjerona, e concluíram que o metanol e etanol foram melhores solventes que outros na extração de compostos fenólicos dos extratos. Também HENÁNDEZ-HERNÁNDEZ e colaboradores (2008) analisaram a concentração de carnosol, ácido rosmarínico e carnósico nas folhas de orégãos e alecrim e concluíram que os extratos etanólicos continham concentrações elevadas nestes fenóis, principalmente ácido rosmarínico, mostrando a eficiência deste solvente para extrair este tipo de compostos. O total de compostos fenólicos de extratos etanólicos e aquosos de tomilho também foram analisados por MATA e colaboradores (2007) usando o método de Folin-Ciocalteu. Os valores encontrados foram maiores para o extrato etanólico o que mais uma vez evidencia a eficiência do etanol na extração dos polifenóis. Por outro lado, a utilização de soluções de etanol ou metanol contendo uma percentagem de água tem mostrado ser mais efetiva na extração de compostos antioxidantes do que a utilização destes solventes puros (RICE-EVANS *et al.*, 1997).

Neste trabalho optou-se por realizar os extratos com as plantas tal como são utilizadas na alimentação, ou seja, optou-se pela utilização das plantas frescas. Esta opção prendeu-se com o facto dos processos enzimáticos e químicos que ocorrem durante a secagem poderem levar a oxidações e, outras alterações significativas da composição fitoquímica das plantas em análise (CAPECKA *et al.*, 2005).

3.1. Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

Através do método Folin-Ciocalteu, foram determinados os compostos fenólicos totais, expressos em mg equivalentes de ácido gálico por litro de extrato (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Compostos fenólicos totais (média \pm desvio padrão) nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Compostos fenólicos totais (mg eq ác.gálico/L)			
Planta	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	3206 ^{a, A} \pm 56	1379 ^{c, A} \pm 66	2284 ^{b, A} \pm 94
Tomilho limão	1973 ^{a, B} \pm 209	690 ^{c, B} \pm 68	1058 ^{b, B} \pm 42

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

Comparando os extratos das duas plantas obtidos em condições semelhantes, é possível verificar que os extratos de orégãos têm sempre um teor em compostos fenólicos totais superior ao dos extratos de tomilho limão. Assim, apesar destas duas plantas pertencerem à mesma família (*Lamiaceae*), têm diferenças no conteúdo de compostos fenólicos totais. Estas diferenças devem resultar maioritariamente das diferenças nas suas características genéticas, podendo ainda ser acentuadas por diferenças nas condições edafoclimáticas ou das condições de crescimento e época de colheita da planta, que se sabe poderem influenciar a concentração de compostos fenólicos (POIROUX-GONORD *et al.*, 2010).

Os elevados teores em compostos fenólicos apresentados pelas duas plantas e o facto do teor em compostos fenólicos totais apresentado pelos extratos de orégãos ser superior aos do tomilho limão está de acordo com os resultados reportados por outros autores. Assim, ZHENG & WANG (2001) estudaram oito espécies da família *Lamiaceae* e reportaram que o orégão fresco apresentava o conteúdo fenólico mais alto. ZÁCARI (2008) determinou compostos fenólicos de cinco plantas pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo que, das plantas analisadas, os orégãos e o tomilho foram as que mais se destacaram, apresentando maiores concentrações de compostos fenólicos.

Os resultados mostraram que apesar da solubilização de compostos fenólicos não ser completa, uma vez que o extrato em etanol foi sempre o que apresentou uma concentração mais elevada, uma grande percentagem dos compostos fenólicos totais presentes nestas plantas consegue ser solubilizada no decurso da digestão gastrointestinal. Assim, em relação aos orégãos verificou-se que cerca de 43% do total de compostos fenólicos se solubilizaram duran-

te a digestão gástrica aumentando este valor para 71% no final da digestão total (gastrointestinal). No caso do tomilho limão verificou-se que 35% do total de compostos fenólicos se solubilizaram durante a digestão gástrica aumentando este valor para 54% no final da digestão total.

A observação destes valores permite verificar que os compostos fenólicos presentes nos orégãos têm uma maior bioacessibilidade que os presentes no tomilho limão. Esta diferença pode indicar uma mais fácil solubilização dos compostos presentes nos orégãos ou que os compostos fenólicos do tomilho limão são mais sensíveis ao processo de digestão. De acordo com o descrito em diversos estudos, os compostos fenólicos podem ser não ser extraídos ou ser sensíveis às condições de digestão (CHIANG *et al.*, 2013; NIMALARATNE, 2015; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010). Alguns estudos realizados indicam que as diferentes estruturas dos compostos fenólicos conferem um ponto diferencial no que diz respeito ao seu comportamento no processo digestivo. Desta forma, consoante a sua estrutura, as suas perdas podem variar desde o negligenciável até à degradação quase total (GIÃO *et al.*, 2012).

No seu conjunto é possível verificar que para ambas as plantas a maior percentagem de compostos fenólicos foi solubilizada durante a fase gástrica (cerca de 60 a 65% do total de compostos fenólicos solubilizados durante a simulação da digestão). Assim, os compostos fenólicos submetidos ao processo digestivo estão presentes a partir do estômago, indicando que a digestão gástrica liberta os compostos funcionais da matriz alimentar, isto é, torna-os bioacessíveis. Apesar de ser principalmente no estômago que a extração dos compostos fenólicos ocorre, o intestino também tem a capacidade de os libertar.

O aumento do conteúdo em compostos fenólicos totais que ocorre entre o final da fase gástrica e o final da digestão total sugere que esta transição facilite a libertação dos compostos fenólicos da matriz alimentar em que estão inseridos, o que pode ser explicado pela mudança de pH, pelo efeito das enzimas digestivas intestinais (RIBEIRO, 2016), e principalmente neste ensaio, pelo tempo adicional de extração, uma vez que a realização da etapa intestinal implica uma duplicação do tempo de extração.

3.2. Quantificação dos Flavonóides Totais

A determinação dos flavonóides totais, expressos em mM equivalentes de catequina por litro de extrato, foi realizada através do método de complexação com o alumínio na presença de nitrito (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Teor em flavonóides totais (média \pm desvio padrão) nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Flavonóides totais (mM eq catequina/L de extrato)			
Planta	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	9,44 ^{a, A} \pm 0,41	1,75 ^{c, A} \pm 0,24	2,80 ^{b, A} \pm 0,18
Tomilho limão	5,20 ^{a, B} \pm 0,73	0,70 ^{c, B} \pm 0,07	0,87 ^{b, B} \pm 0,04

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

Os resultados indicaram, que tal como verificado no teor em fenóis totais, o teor de flavonóides totais foi, igualmente, superior nos extratos de orégãos em relação aos extratos de tomilho (extrato etanólico, após digestão gástrica e digestão total). Nas duas plantas aromáticas o teor de flavonóides totais foi superior nos extratos etanólicos e mais baixo nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica.

Em relação aos flavonóides totais verificou-se que apenas uma pequena percentagem conseguiu ser solubilizada e/ou permaneceu estável nas condições da simulação da digestão. Assim, em relação aos orégãos verificou-se que cerca de 18% do total de flavonóides se solubilizaram durante a digestão gástrica aumentando este valor para 30% no final da digestão total (gastrointestinal). No caso do tomilho limão verificou-se que 13% do total de flavonóides se solubilizaram durante a digestão gástrica aumentando este valor para 17% no final da digestão total. Mais uma vez, foi no decurso do passo gástrico que se verificou a maior extração destes compostos. No caso dos orégãos 62% dos flavonóides solubilizados no decurso da digestão total foram extraídos no estômago, enquanto que no caso do tomilho limão este valor correspondeu a 81% do total.

Tal como verificado no caso dos fenóis totais, também em relação aos flavonóides se verificou que, embora a maior parte dos compostos seja solubilizada na fase gástrica, ainda há compostos que apenas ficam solubilizados do decurso da etapa intestinal, especialmente no caso dos orégãos. Mais uma vez os fatores pH, enzimas e tempo de extração podem explicar este resultado. Também neste caso se verificou uma maior bioacessibilidade dos flavonóides dos orégãos em relação aos do tomilho limão.

Poucos são os resultados encontrados na literatura para análise de flavonóides totais dos orégãos e tomilho limão, o que realça a importância da análise efetuada no presente estudo. Porém, FERNANDES e colaboradores (2017) analisaram um extrato de orégãos (*Origanum vulgare*) e identificaram 25 compostos fenólicos, sendo os flavonóides os compostos mais

abundantes. LICINA e colaboradores (2013) determinaram o teor de flavonóides totais no extrato de orégãos usando o método de cloreto de alumínio. As concentrações de flavonóides obtidas nesse estudo situaram-se entre os 57,1 e 132 mg de rutina/g de amostra. As diferenças no método de preparação das amostras e nas unidades em que se expressou o resultado impossibilita uma comparação direta com os resultados obtidos. ALMEIDA (2013) determinou o teor de flavonóides totais do extrato etanólico de tomilho tendo chegado a uma concentração de 23, 46 mg eq. de quercetina/g de amostra. Também HOSSAIN e colaboradores (2013) analisaram o teor de flavonóides totais em extratos de tomilho preparados com diferentes solventes tendo obtido um máximo de 1,71 mg de quercetina/g, no extrato preparado com metanol. Mais uma vez, a diferença nos métodos de preparação e análise das amostras bem como nas unidades utilizadas impossibilitam a comparação direta de resultados.

3.3. Determinação da actividade antioxidante das diferentes plantas aromáticas.

Uma vez que não existe um método universal para analisar a actividade antioxidante de uma amostra, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diversos ensaios de avaliação do potencial antioxidante aos extratos etanólicos e aos resultantes da simulação da digestão gástrica e gastrointestinal. Assim, realizaram-se dois ensaios de determinação da capacidade redutora (ensaios CUPRAC e FRAP) e três ensaios de sequestro de espécies radicalares (sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS e anião superóxido).

3.3.1. Sequestro do radical DPPH[•]

O ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) determina a actividade antioxidante, expressa em mg equivalentes de ácido ascórbico/L de extrato. Os resultados obtidos para as diferentes amostras encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Actividade antioxidante (média \pm desvio padrão) detetada pelo ensaio DPPH nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

mg Eq de ácido ascórbico/L de extrato			
Planta	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	1661,92 ^{a, A} \pm 7,53	174,19 ^{c, A} \pm 3,24	390,95 ^{b, A} \pm 28,18
Tomilho limão	1559,24 ^{a, B} \pm 2,05	58,49 ^{c, B} \pm 2,37	71,99 ^{b, B} \pm 1,26

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 3.3 permite verificar que as amostras de orégãos (extrato etanólico, após digestão gástrica e digestão total) apresentaram uma maior atividade antioxidante em comparação com os respetivos extratos de tomilho limão, o que sugere o envolvimento dos fenóis, em particular dos flavonóides, na atividade antioxidante detetada por este ensaio. Este resultado já era do esperado dado já ter sido descrita por diversos autores a existência de uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos alimentos (FALLARERO, 2003; KUSKOSKI *et al.*, 2005). Contudo, a diferença de valores de atividade antioxidante entre os extratos etanólicos das duas plantas, embora sendo significativa, não é tão acentuada como a verificada nos ensaios anteriores (determinação de fenóis e de flavonóides totais).

Do total de compostos, presente nas amostras, com capacidade de sequestrar o radical DPPH[•], apenas uma pequena fração se encontra solúvel e ativa no final da digestão gástrica e da digestão total (gastrointestinal). Com efeito, no que diz respeito aos orégãos verificou-se que a atividade de sequestro do DPPH no final do passo gástrico foi cerca de 11% da registada pelo extrato etanólico, aumentando este valor para 24% no final da digestão gastrointestinal. No que diz respeito ao tomilho limão os valores são ainda mais baixos, tendo os extratos gástricos e gastrointestinal registado apenas, respetivamente, cerca de 4% e 5% da atividade do extrato etanólico. A análise destas percentagens de atividade permite, mais uma vez, verificar uma maior bioacessibilidade dos antioxidantes presentes nos orégãos quando comparados com os antioxidantes presentes no tomilho limão.

Na amostra de orégãos, o passo intestinal ainda permitiu solubilizar uma fração importante dos compostos antioxidantes, visto a atividade no final do passo gástrico ter sido apenas 45% da atividade registada no final da digestão total. Pelo contrário, na amostra de tomilho limão a quantidade de compostos antioxidantes solubilizada durante a etapa gástrica teve um peso muito superior (cerca de 81%) no total de antioxidantes solubilizados no decurso da

digestão gastrointestinal. Tal como anteriormente referido a diferença de resultados obtida em ambas as etapas da digestão pode dever-se às diferenças de pH, tempo de extração e às atividades das várias enzimas que vão sendo adicionadas. Todos estes valores podem interferir com a solubilização dos compostos ou com a sua estabilidade e atividade.

São escassas as informações encontradas na literatura sobre a atividade antioxidante dos orégãos e tomilho limão após a digestão, embora, atualmente os estudos desenvolvidos começam a direcionar-se para a avaliação das possíveis alterações na atividade antioxidante de diferentes productos alimentares após a digestão gastrointestinal (NIMALARATNE, 2015). Contudo a menor atividade antioxidante que se verifica nos extratos obtidos por simulação da digestão gastrointestinal em relação aos extratos etanólicos pode resultar, por um lado, de uma diferente solubilização dos compostos antioxidantes resultante das diferenças de condições em que estes extratos são realizados. Por outro lado, esta diferença pode também espelhar uma menor estabilidade dos compostos fenólicos nas condições da digestão. Com efeito, as condições da digestão podem transformar os compostos fenólicos em diferentes formas estruturais, sendo que estas diferenças podem originar resultados de atividades antioxidante distintos (RIBEIRO, 2016).

Diversos estudos relataram que os extractos de orégãos têm uma elevada capacidade antioxidante. Um estudo de GAWLIH-DZIKI (2012) demonstrou o maior potencial antioxidante do extrato de orégão em comparação com outros extratos de plantas. LICINA e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante através da capacidade de sequestro de radical DPPH[•], dos extratos de orégão (*Origanum vulgare* L.) com diferentes solventes tendo o extrato etanólico sido o mais activo. Outros autores analisaram a atividade antioxidante de alguns extratos de plantas da família das *Lamiaceae*, incluindo os orégãos, e atribuíram a sua atividade de sequestrar o radical DPPH[•] aos compostos fenólicos e, em particular, aos flavonóides (ECONOMOU *et al.*, 1991; SPIRIDON *et al.*, 2011; ŠKERGET *et al.*, 2005). Também SAHIN e colaboradores (2004) descreveram que as fortes propriedades dos extratos de orégão para sequestrar os radicais DPPH[•] são devidas aos compostos fenólicos.

ALMEIDA (2013) analisou a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de tomilho e verificou que, estes extratos, demonstraram capacidade para capturar radicais livres. HAMDY e colaboradores (2012) analisaram a atividade antioxidante e compostos fenólicos em extratos de tomilho, sálvia e manjerona e concluíram que os valores mais altos da atividade de sequestro do radical DPPH[•] verificada nos extratos de tomilho poderia ser devido ao seu maior conteúdo em compostos fenólicos.

3.3.2. Determinação da actividade de redução do Fe (III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Os valores FRAP para as diferentes amostras analisadas encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Actividade antioxidante (média \pm desvio padrão) detetada pelo ensaio FRAP nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Planta	Valor FRAP (mmol Fe ²⁺ /L de extrato)		
	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	37,95 ^{a, A} \pm 0,55	5,61 ^{c, A} \pm 0,01	11,41 ^{b, A} \pm 1,27
Tomilho limão	20,80 ^{b, B} \pm 1,23	3,36 ^{c, B} \pm 0,81	5,82 ^{b, B} \pm 0,59

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

O ensaio da capacidade antioxidante por meio do teste FRAP demonstrou que, em relação ao tomilho limão, o orégano possui maior atividade antioxidante, quer no extrato etanólico quer após a digestão *in vitro*. Deste modo, também no ensaio FRAP a atividade antioxidante apresentou uma correlação positiva com o teor de fenóis e flavonóides totais, uma vez que os extratos de orégãos também apresentaram maior conteúdo nestes compostos. Também é possível verificar que, através da digestão *in vitro*, se obtém uma atividade antioxidante inferior à que se consegue obter através da realização de extratos etanólicos e que a capacidade antioxidante após a digestão gástrica é menor do que após a digestão total.

O extrato obtido por digestão gástrica dos orégãos apresentou cerca de 15% da atividade de FRAP apresentada pelo respetivo extrato etanólico, enquanto que extrato obtido por digestão total apresentou cerca de 30% da atividade FRAP apresentada pelo extrato etanólico. No caso do tomilho limão a atividade FRAP no final das fases gástrica e gastrointestinal foi, respetivamente, cerca de 16% e 28% da atividade apresentada pelo extrato etanólico. Em ambas as plantas em estudo, o passo intestinal ainda permitiu solubilizar uma fração importante dos compostos antioxidantes, visto a atividade FRAP no final do passo gástrico ter representado cerca de 45% para os orégãos e cerca de 58% para o tomilho limão da atividade FRAP registada no final da digestão total.

SILVA-MATIOLLI (2014) analisou a atividade antioxidante de plantas aromáticas, incluindo os orégãos, e concluiu que as plantas que apresentaram maior atividade antioxidante por meio do teste FRAP também demonstraram maior quantidade de fenóis e flavonóides totais. EMBUSCADO (2015) fez uma revisão sobre as especiarias e plantas como fontes naturais de

antioxidantes, onde apresentou a atividade antioxidante, por meio do ensaio FRAP, do orégano e tomilho, analisado por CARLSEN e colaboradores (2010). Assim para o extrato das folhas de orégano a atividade antioxidante variou entre os 63,2 e 84,0 mmol/100 g de amostra, e para o tomilho os valores variaram entre os 56,3 e 59,1 mmol/100 g de amostra. As diferenças na forma de expressar os resultados impedem uma comparação mais aprofundada com os resultados obtidos no presente estudo, mas, apesar das diferenças, é possível verificar que, tal como no presente estudo, os orégãos também apresentaram uma atividade antioxidante (FRAP) superior à do tomilho.

3.3.3. Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC.

Os valores CUPRAC das amostras testadas encontram-se apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Atividade antioxidante (média \pm desvio padrão) detetada pelo ensaio CUPRAC nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Valor de CUPRAC (μ mol ácido ascórbico/L de extrato)			
Planta	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	38,57 ^{a, A} \pm 4,95	11,56 ^{c, A} \pm 0,17	21,07 ^{b, A} \pm 0,23
Tomilho limão	24,47 ^{a, B} \pm 1,00	5,21 ^{c, B} \pm 0,13	8,69 ^{b, B} \pm 0,38

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

Tal como nos ensaios anteriores também no ensaio as amostras de orégãos (extrato etanólico, após digestão gástrica e digestão total) apresentaram uma capacidade antioxidante superior às de tomilho limão. Em ambas as plantas a atividade antioxidante nos extratos etanólicos foi superior à verificada nas amostras resultantes da simulação da digestão gástrica e gastrointestinal.

O extrato obtido por digestão gástrica do orégano apresentou cerca de 30% da atividade CUPRAC apresentada pelo respetivo extrato etanólico, enquanto que extrato obtido por digestão total apresentou cerca de 55% da atividade CUPRAC apresentada pelo extrato etanólico. No caso do tomilho limão a atividade CUPRAC no final das fases gástrica e gastrointestinal foi, respetivamente, cerca de 21% e 35% da atividade apresentada pelo extrato etanólico. Assim, mais uma vez se verificou uma maior bioacessibilidade dos compostos antioxidantes dos orégãos em relação aos do tomilho limão. Também neste ensaio se verificou um aumento da ati-

dade antioxidante durante a simulação da fase intestinal da digestão. Assim, a atividade CUPRAC no final do passo gástrico representou cerca de 55% para os orégãos e cerca de 60% para o tomilho limão da atividade CUPRAC registada no final da digestão total.

A concordância entre os resultados obtidos neste ensaio e nos ensaios anteriores sugere, igualmente, o envolvimento dos compostos fenólicos nesta atividade. Mais uma vez o facto dos extratos etanólicos serem os que apresentaram atividades mais elevadas pode relacionar-se com as diferenças das condições de extração bem como com a possibilidade dos compostos fenólicos sofrerem alterações estruturais durante o processo de digestão gastrointestinal que possam originar diferenças na sua atividade antioxidante.

3.3.4. Capacidade antioxidante Trolox equivalente (TEAC) - ABTS.

Os valores ABTS⁺⁺ das amostras testadas encontram-se apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Actividade antioxidante (média \pm desvio padrão) detetada pelo ensaio ABTS nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Valor de ABTS ⁺⁺ (mmol eq. de Trolox/L de extrato)			
Planta	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	145,43 ^{a, A} \pm 0,94	13,17 ^{c, A} \pm 0,60	58,38 ^{b, A} \pm 3,33
Tomilho limão	73,44 ^{a, B} \pm 6,12	12,38 ^{c, A} \pm 1,97	39,90 ^{b, B} \pm 4,57

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

O ensaio do sequestro do radical ABTS⁺⁺ demonstrou que, quer o extrato etanólico quer a amostra no final da simulação da digestão gastrointestinal dos orégãos possuem maior facilidade de capturar este radical que os mesmos extrato de tomilho limão. Também neste ensaio a atividade antioxidante se correlacionou de forma positiva com o teor de fenóis e flavonóides totais. Verificou-se mais uma vez, em ambas as plantas, que a atividade antioxidante após a simulação da digestão foi inferior à obtida nos respectivos extratos etanólicos e que esta atividade aumentou durante a simulação da etapa intestinal. Assim, a capacidade de sequestro do ABTS no final do passo gástrico representou para os orégãos e para o tomilho limão cerca de 23% e 31%, respetivamente da atividade de sequestro registada no final da digestão total.

A atividade de sequestro do radical ABTS no final do passo gástrico da digestão dos orégãos foi cerca de 9% da atividade antioxidante do extrato etanólico, tendo este valor aumentado para 40% no final da digestão total. No caso do tomilho limão, verificou-se que no final da digestão gástrica a capacidade de sequestro do radical ABTS foi cerca de 17% da atividade antioxidante do extrato etanólico, tendo este valor aumentado para 54% no final da digestão total. Assim, ao contrário do verificado nos ensaios anteriores, neste caso, verificou-se uma maior bioacessibilidade dos compostos antioxidantes do tomilho limão em relação aos dos orégãos. Esta diferença sugere que os compostos responsáveis por esta atividade e pelas atividades antioxidantes anteriormente detetadas nos outros ensaios realizados não sejam exatamente os mesmos.

Conforme já anteriormente salientado, diversos estudos descrevem que os compostos fenólicos podem ser sensíveis a condições de digestão (CHIANG *et al.*, 2013), e esta sensibilidade pode contribuir para a atividade antioxidante após a digestão *in vitro* ser inferior à dos extratos etanólicos.

CASEMIRO, (2016) analisou a capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} de extratos de orégano, tomilho e alecrim e observou que, de todas essas plantas, o extrato de orégano foi o que apresentou maior atividade antioxidante frente a este radical, com um valor de 365,38 $\mu\text{mol/g}$ de amostra, enquanto o extrato de tomilho apresentou 151,03 $\mu\text{mol/g}$ de amostra. Este autor também verificou que quanto maior o teor de compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante. À diferença na expressão dos resultados, dificulta uma comparação com os resultados do presente trabalho, mas apesar dessa diferença, verificou-se que os extratos de orégãos apresentaram atividades superiores aos de tomilho, o que concorda com os resultados obtidos no presente estudo.

GÓMEZ-ESTACA e colaboradores (2009) analisaram as atividades antioxidantes de extratos aquosos de orégano e alecrim. Estes autores observaram que o extrato de orégano apresentava maior teor de fenóis totais e maior atividade antioxidante, e que o ácido rosmarínico foi o composto fenólico mais abundante. Na capacidade de capturar o radical livre ABTS^{•+}, a atividade antioxidante foi mais elevada para o extrato de orégano (1,048 mg eq. de ácido ascórbico/mL de extrato) que no extrato de alecrim (0,141 mg eq. de ácido ascórbico/mL de extrato). Outros investigadores têm trabalhado com extratos aquosos e alcoólicos e também relataram concentrações mais elevadas de ácido rosmarínico em orégano comparado com o alecrim (SHAN *et al.*, 2005; ZHENG & WANG, 2001), o que sugere que o ácido rosmarínico possa ser um dos principais responsáveis pela elevada atividade antioxidante dos orégãos.

3.3.5. Determinação da actividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido.

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido é um ensaio com elevada relevância biológica dada a possibilidade de formação *in vivo* deste radical. Os valores de sequestro do radical anião superóxido das amostras testadas encontram-se apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Actividade antioxidante (média \pm desvio padrão) detetada pelo ensaio de sequestro do radical anião superóxido nos extratos etanólicos e nos extratos obtidos por simulação da digestão gástrica e gastrointestinal dos orégãos e do tomilho limão.

Planta	Capacidade de sequestro do $O_2^{\cdot -}$ (mmol eq. de ác.gálico/L de extrato)		
	Extrato Etanólico	Digestão Gástrica	Digestão Gastrointestinal
Orégãos	93,90 ^{a, A} \pm 5,99	28,45 ^{c, A} \pm 1,21	57,42 ^{b, A} \pm 0,60
Tomilho limão	90,61 ^{a, A} \pm 18,41	27,52 ^{c, A} \pm 2,55	63,05 ^{b, A} \pm 6,67

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste t ($p < 0,05$). Letras minúsculas significam diferenças significativas entre extratos diferentes para a mesma planta. Letras maiúsculas significam diferenças significativas entre plantas para o mesmo tratamento.

Todas as amostras apresentaram capacidade de sequestrar o radical anião superóxido. Verificou-se mais uma vez, em ambas as plantas, que a atividade antioxidante após a simulação da digestão foi inferior à obtida nos respectivos extratos etanólicos e que esta atividade aumentou durante a simulação da etapa intestinal. Assim, a capacidade de sequestro do radical anião superóxido no final do passo gástrico representou para os orégãos e para o tomilho limão cerca de 50% e 44%, respetivamente da atividade de sequestro registada no final da digestão total.

Contudo, neste ensaio não se verificaram diferenças significativas entre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos, gástricos e gastrointestinais das duas plantas. A atividade de sequestro do radical anião superóxido no final do passo gástrico da digestão dos orégãos foi cerca de 30% da atividade antioxidante do extrato etanólico, tendo este valor aumentado para 61% no final da digestão total. No caso do tomilho limão, verificou-se que no final da digestão gástrica a capacidade de sequestro do radical anião superóxido foi cerca de 30% da atividade antioxidante do extrato etanólico, tendo este valor aumentado para 70% no final da digestão total. Assim, tal como verificado no ensaio do ABTS, neste ensaio verificou-se igualmente uma maior bioacessibilidade dos compostos antioxidantes do tomilho limão em relação aos dos orégãos. Esta diferença sugere que os compostos maioritariamente responsáveis por esta atividade e pelo sequestro do ABTS possam ser os mesmos, enquanto que os compostos maiorita-

riamente envolvidos nos restantes ensaios de atividade antioxidante realizados devam ser outros. O facto dos extratos de tomilho limão terem menor teor em fenóis e flavonóides totais do que os extratos de orégãos, tendo, no entanto, uma capacidade para sequestrar o radical anião superóxido idêntica, pode resultar de apenas alguns dos compostos fenólicos contribuírem para esta atividade. Com efeito, nem sempre o efeito antioxidante depende da concentração total de compostos fenólicos, podendo apenas correlacionar-se com a concentração de alguns compostos específicos.

3.4. Determinação da actividade antimicrobiana das plantas aromáticas.

A actividade antimicrobiana das amostras foi determinada através do método de difusão em placa, pela da medição dos halos de inibição do crescimento das diferentes bactérias, em milímetros, que surgiram à volta da zona onde foi colocada a amostra. Neste ensaio apenas se conseguiu observar inibição do crescimento com os extratos etanólicos e apenas em relação às bactérias gram-positivas estudadas (Tabela 3.8).

Tabela 3.8. Efeito inibitório dos extratos etanólicos de orégãos e de tomilho limão no crescimento das diferentes bactérias.

Orégano	Diâmetro do halo de inibição (mm)					
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>
Extrato etanólico de oregãos	110	80	--	85	--	90
Extrato etanólico de tomilho limão	90	95	--	75	--	90

-- = sem efeito.

Assim, os extratos etanólicos de ambas as plantas conseguiram inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas; *Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, sem apresentar efeito nas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*. Os extratos da digestão gástrica e digestão total não apresentaram nenhuma atividade inibitória. Esta diferença pode resultar da maior concentração em compostos fenólicos que se verifica nos extratos etanólicos ou do facto dos compostos fenólicos responsáveis pela actividade antimicrobiana terem sido sensíveis à digestão gastrointestinal.

A especificidade dos extratos em relação às bactérias gram-positivas pode relacionar-se com as diferenças na estrutura da parede que estas bactérias têm em relação às Gram-negativas. Assim, as bactérias Gram-negativas têm uma membrana externa que possui lipopolisacáridos e que pode condicionar o acesso dos compostos antimicrobiano ao interior da célula (CHOPRA & GREENWOOD, 2001; CABEEN & JACOBS-WAGNER, 2005). Isto faz com que geralmente as bactérias Gram-negativas sejam menos susceptíveis aos extratos de plantas que as bactérias Gram-positivas.

Os resultados obtidos estão de acordo com os publicados por CHIANG-CHAN e colaboradores (2012). Estes autores analisaram as propriedades antibacterianas de algumas plantas da família das *Lamiaceae* (orégãos, tomilho, alecrim, etc.) frescas e secas. Todas as plantas testadas, quer frescas quer secas, não apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*, tendo apresentado contra as Gram-positivas. Assim, nas ervas frescas, o tomilho apresentou efeito inibitório contra o *Micrococcus luteus* e o *Staphylococcus aureus*, os orégãos só inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

MOSTAFA e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de cinco plantas, entre eles o tomilho, contra bactérias responsáveis pelo aparecimento de intoxicações alimentares, incluindo duas bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e três bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*), usando o método de difusão em agar. Neste trabalho o tomilho foi efetivo contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A diferença de resultados obtida pode estar relacionada com a espécie de tomilho utilizada, com diferenças nos métodos e condições de cultivo bem como no método de extração.

As plantas são ricas em uma variedade de compostos antimicrobianos tais como saponinas, taninos, alcalóides, glicoalcaloides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas e terpenóides (LEWIS & AUSUBEL, 2006; TAJKARIMI, *et al.*, 2010). Foram publicados numerosos estudos sobre as propriedades antimicrobianas dos metabolitos de produtos vegetais (BAJPAI *et al.*, 2008; TAJKARIMI *et al.*, 2010; TIWARI *et al.*, 2009). Os polifenóis, e particularmente os flavonóides têm actividade antibacteriana contra uma gama de microrganismos patogénicos (CUSHNIE & LAMB, 2005). As diferenças na composição em compostos polifenólicos podem contribuir para as diferenças de atividade antimicrobiana que se verificam entre diferentes plantas (DAGLIA, 2012).

4. Conclusão

As ervas aromáticas são tradicionalmente usadas como ingredientes alimentares para acrescentar aroma ou sabor aos alimentos, bem como para aumentar a sua preservação protegendo-os da degradação oxidativa. Sabe-se que os compostos químicos de plantas aromáticas são ingredientes biologicamente activos sendo directamente responsáveis por diferentes actividades, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e anticancerígena.

A maioria dos estudos avalia a atividade antioxidante nativa das matrizes alimentares pela extração química dos compostos fenólicos e determinação da respetiva atividade antioxidante. Porém o teor extraído neste processo pode diferir quantitativa e qualitativamente dos que são realmente extraídos no processo digestivo, observando-se, em alguns dos ensaios já realizados uma diminuição dos compostos fenólicos quando é considerado o processo digestivo. Tal pode sugerir que a extração química possa sobrestimar a disponibilidade dos componentes ativos dos alimentos. Este facto pode, também, indicar que durante o processo digestivo, uma parte dos compostos fenólicos poder ser degradada e/ou que estes compostos podem não ser extraídos da matriz na sua totalidade (RIBEIRO, 2016).

O objetivo deste trabalho foi então o avaliar a bioacessibilidade dos compostos antioxidantes e antimicrobianos duas plantas aromáticas de consumo comum na cozinha tradicional portuguesa nomeadamente os oregãos (*Origanum vulgare* L.) e o tomilho limão (*Thymus x citriodorus* L.).

Para isso realizaram-se simulações *in vitro* do processo de digestão gástrica e gastrointestinal, avaliando a quantidade de fenóis e flavonóides totais bem como a capacidade antioxidante e antimicrobiana do extratos obtidos através de cada um destes processos. Estes extratos permitiram avaliar a quantidade de compostos bioativos que se conseguiu solubilizar da matriz da planta ao longo do processo de digestão (fração bioacessível). Para ter uma ideia do potencial antioxidante e antimicrobiano destas plantas, os extratos obtidos por simulação do processo de digestivo foram sempre comparados com extratos preparados com etanol 70%, utilizando a mesma proporção massa de planta/volume de solvente.

Os resultados mostraram que todos os extratos de ambas as plantas em estudo possuem capacidade antioxidante em todos os ensaios efectuados. Contudo, a atividade antioxidante após simulação da digestão gastrointestinal foi estatisticamente inferior à obtida nos extratos etanólicos. O que suporta a hipótese da extração com solventes poder não ser o melhor método para avaliar as atividades biológicas, em particular a atividade antioxidante, dos alimentos.

No entanto, apesar de nos ensaios efetuados a atividade antioxidante detetada em ambas as fases de digestão ser inferior à dos extratos em etanol, o que aponta no sentido da digestão gastrointestinal não conseguir extrair todo o potencial antioxidante destas plantas ou levar à destruição de alguns dos seus compostos bioativos, a atividade antioxidante obtida sugere que tanto os orégãos como o tomilho limão ainda possam desempenhar um papel importante na defesa antioxidante, em particular atuando na desativação de espécies reativas de oxigénio que se possam formar no aparelho digestivo.

Para se conseguir com melhor precisão estabelecer associações entre as actividades biológicas estudadas e os compostos que as originam, teria todo o interesse efectuar uma análise química mais detalhada das plantas aromáticas estudadas. Assim, este estudo ficaria mais completo com a determinação do perfil em compostos fenólicos e com a identificação e quantificação de outros compostos, antes e principalmente após a digestão gástrica e digestão total. Desta forma, seria possível estudar estes compostos isoladamente e realizar uma melhor identificação dos principais compostos bioativos presentes nos extratos e da forma como cada um deles é afectado pela digestão gastrointestinal.

A extrapolação destes resultados para a situação *in vivo* não pode ser imediata. Com efeito o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas reais. Apesar de existirem alguns estudos que incluem a influência do processo digestivo na determinação da actividade antioxidante de certos componentes alimentares, ainda há muito por fazer, uma vez que os modelos *in vitro* disponíveis ainda estão longe de mimetizar o que ocorre *in vivo*. Adicionalmente existem outros fatores a considerar como, a complexidade e grande variabilidade individual do processo digestivo (RIBEIRO, 2016). Assim, para uma simulação mais precisa das condições *in vivo*, devem ser utilizados os modelos dinâmicos (MINEKUS et al., 2014). Estes modelos mimetizam processos físicos e mecânicos, incluindo fluxos dinâmicos do alimento e modificações graduais de pH e enzimas, permitindo assim alcançar condições mais próximas das condições *in vivo* (CILLA et al., 2013).

5. Referências Bibliográficas

- AL-GUBORY, K., FOWLER, P. & GARREL, C., (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**: 1634-1650.
- ALMEIDA, J., (2013). Atividade Antioxidante e microencapsulação de extrato etanólico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), *Departamento de Química - Universidade Tecnológica Federal do Paraná*: 42-45.
- ALVES, C., *et. al.*, (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, **33(10)**: 2202-2210.
- Anon., (2017). Elicriso - *Revista sobre o entorno e a natureza*. [En línea] Available at: www.elicriso.it [Último acceso: 5 Abril 2017].
- ANTOLOVICH, M. *et. al.*, (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**: 183-198.
- APAK, R. *et. al.*, (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, **12**: 1496-1547.
- APAK, R., GÜGLÜ, K., ÖZYÜREK, M. E. & KARADEMIR, S., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 7970-7981.
- ATOUI, A., MANSOURI, A., BOSKOU, G. & KEFALA, P., (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**: 27-30.
- AVELLO, M. & SUWALSKY, M., (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, **49**: 161-172.
- AYAZ, F. A., *et. al.*, (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, **107(1)**: 19-25.
- BAJPAI, V. K., RAHMAN, A. & KANG, S. C., (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **125(2)**: 117-122.
- BARBERÁ, R. & FARRÉ, R., (1992). Bioavailability of trace-elements-review. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **32**: 381-399.
- BARRY, A. L., *et. al.*, (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *Journal Clin. Microbiology*, **10**: 910.

BECKMAN, K. & AMES, B., (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. **78**: 547-581.

BEKTAŞOĞLU, B., *et al.*, (2006). Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**: 1194-1200.

BENZIE, I. & STRAIN, J., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239(1)**: 70-76.

BERTHELO, P., *et.al.*, (2005). Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol. Biol.* Paris, France, **53(6)**: 341-388.

BIANCHI, M. & ANTUNES, L., (1999). Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, **12(2)**: 123-130.

BORGES, L., *et al.*, (2011). Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, **7(12)**: 1-21.

BRAVO, L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **56**: 317-333.

BUONCORE, G., PERRONE, S. & TATARANNO, M. L., (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, **15(4)**: 186-190.

BURT, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94(3)**: 223-253.

BURT, S. A., *et. al.*, (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **73(14)**: 4484-4490.

BUSTOS-MARTÍNEZ, J., HAMDAN-PARTIDA, A. & GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, M., (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.* **17**: 287-305.

CABEEN, M. & JACOBS-WAGNER, C., (2005). Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**: 601-610.

CAPECKA, E., MARECZEK, A., & LEJA, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, **93(2)**: 223–226.

CAREAGA, M., *et. al.*, (2003). Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, **83(3)**: 331-335.

CARLSEN, M. H., *et. al.*, (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, **9**: 1475-2891.

CARVALHO, N., *et. al.*, (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. *Genetics and Molecular Biology*, **34(2)**: 290-297.

CASEMIRO, R., (2016). Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsões com extratos de ervas aromáticas. Universidade de São Paulo: 42-48.

CAUSSY, D., (2003). Case studies of the impact of understanding bioavailability; arsenic. *Ecotox. Environ. Safe.*, **56**: 164-173.

CEDERROTH, C. R. & NEF, S., (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular endocrinology*, **304(1-2)**: 30-42.

CÉSPEDES, T. & SÁNCHEZ, D., (2000). Algunos aspectos sobre estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*, **14**: 55-60.

CEYLAN, E. & FUNG, D. Y., (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **12(1)**: 1-55.

CHAMBERS, H., (1997). Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 781-791.

CHIANG-CHAN, E., *et. al.*, (2012). Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried *Labiatae* herbs. Faculty of Applied Sciences, UCSI University, Kuala Lumpur, Malásia: 20-27.

CHIANG, C., KADOUH, H. & ZHOU, K., (2013). Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *Food Science and Technology*, **51(2)**: 417-422.

CHOPRA, I. & GREENWOOD, D., (2001). Antibacterial agents: basis of action. In: Encyclopaedia of Life Sciences. *Nature Publishing Group*, John Wiley and Sons Ltd.

CILLA, A., ALEGRÍA, A., BARBERÁ, R. & LAGARDA, M. J., (2013). Foods or Bioactive Constituents of Foods as Chemopreventives in Cell Lines After Simulated Gastrointestinal Digestion: A Review. In J. A. Morales-González, *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. México: InTech.: 131-151.

Comite" l'Antibiogramme de la Societe" Franc, (1996). Technical recommendations for in vitro susceptibility testin. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2**: 511.

COOK, N. C. & SAMMAN, S., (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **7(2)**: 66-76.

CORRÊA, C. B., MARTIN, J. G. P., ALENCAR, S. M. & PORTO, E., (2014). Antilisterial activity of broccoli stems (*Brassica oleracea*) by flow cytometry., *International Food Research Journal*, **21(1)**: 395-399.

CRUZ GALLEGOS, J. A., (2012). Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (*In vitro* por difusión de glucosa) en extractos de *Colubrina elliptica*: Departamento de Ciencias Químicas-Biológicas - UTM, pp 20.

CUSHNIE, T. P. & LAMB, A. J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26(5)**: 343-356.

DAGLIA, M., (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23(2)**: 174-181.

DALY, T., JIWAN, M. A., O'BRIEN, N. M. & AHERNE, S. A., (2010). Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Plant Foods for Human Nutrition*, **65(2)**: 164-169.

D'ANTUONO, L., GALLETTI, G. & BOCCHINI, P., (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area (Liguria region, north Italy). *Ann. Bot.*, **86**: 471-478.

DAVIDSON, P. M., (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington DC, USA: 520-556.

DAVIDSON, P. M., (2001). Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed., Washington, USA: 593-628.

DEWICK, P., (1997). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons. Chap. 5:152-213.

DORMAN, H. J., BACHMAYER, O., KOSAR, M. & HILTUNEN, R., (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(4)**: 762-770.

DRASAR, B. & HILL, M., (1974). The distribution of bacterial flora in the intestine. In: Drasar, B.S. ; Hill, M.J. (ed) Human intestinal flora. London, UK Academic Press.

DUCHATEAU, G. S. M. J. E. & KLAFFKE, W., (2008). Product Composition, Structure, and Bioavailability. *Food Biophysics*, **3(2)**: 207-212.

ECONOMOU, K. D., OREOPOULOU, V. & THOMOPOULOS, C. D., (1991). Antioxidant activity of some plant extracts of the family *Labiatae*. *Journal of American Oil Chemists Society*, **68**: 109-113.

EKMEKCIOGLU, C., (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, **76(2)**: 225-230.

EMBUSCADO, M., (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional foods*, **18**: 2 - 9.

FACKLAM, R. & COLLINS, M., (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal Clin. Microbiol.*, **27(4)**: 731-734.

FAILLA, M. L. & CHITCHUMROONCHOKCHAI, C., (2005). *In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. *Harvest Plus Technical Monograph*, **3**: 32.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J., (1996). Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.*, **9**: 295.

FALLARERO, A. *et al.*, (2003). Efeitos de extratos aquosos de *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux e *Bryothamnion trquetrum* (SG Gmelim) Howe em peróxido de hidrogênio e metil estresse oxidativo induzido por mercúrio em GT1-7 rato hipotálamo células imortalizadas. *Fitoterápico*, **10(1)**: 39-47.

FECKA, I. & TUREK, S., (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: Thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, **108(3)**: 1039-1053.

FENNEL-EVANS, D. & WENNERSTRÖM, H., (1994). *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*, 2nd Ed. New York, USA.

FERGUSON, L., (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**: 89-111.

FERNANDES, R., *et al.*, (2017). Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chemistry* **233**: 101-109.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. & PÉREZ-GÁLVEZ, A., (2012). Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8(3)**: 379-384.

FERREIRA, H. & E.R.P., L., (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev. Panam. Infectol.*, **12(2)**: 44-50.

FERREIRA, I. & ABREU, R., (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, **2**: 32-39.

FERREIRA, W.F.C. & AOUSA, J.C.F. (2000). Microbiologia: Volume.2. Lidel, Lisboa, pp.40-49; 65-67;100-109.

FERRUZZI, M. G., (2010). The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology and Behavior*, **100(1)**: 33-41.

FESTY, D., (2007). Oxidantes y antioxidantes: guía práctica. Ediciones Robinboock, Barcelona, España: 256.

FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J., (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature International Journal of Scienc*, **408**: 239-247.

FOSTER, B., ARNASON, J. & BRIGGS, C., (2005). Natural health products and drug disposition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**: 203-226.

FOTI, M., DAQUINO, C. & GERACI, C., (2004). Electron- transfer reaction of cinnamic acids their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solution. *Journal Organic Chemistry*, **69**: 2309-2314.

GALLEANO, M., VERSTRAETEN, S., OTEIZA, P. I. & FRAGA, C., (2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **50(1)**: 23-30.

GARCIA MARTINEZ, E., FERNANDEZ SEGOVIA, I. & FUENTES LÓPEZ, A., (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu. Departamento de Tecnología en Alimentos, Universitat Politècnica de Valencia, España.

GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A. & FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, **15(2)**: 8813-8826. Basel, Switzerland.

GAWLIH-DZIKI, U., (2012). Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase,xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. *Food Science and Technology* **47**: 138-146.

GHADGE, G., *et. al.*, (1997). Mutant Superoxide Dismutase-1- Linked Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms of Neuronal Death an Protection. *Journal of Neuroscience*, **17**: pp 8756.

GIÃO, M., *et. al.*, (2012). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*, **131**: 761-767.

GIRÓN-GONZÁLEZ, J. & PÉREZ-CANO, R., (2003). Treatment of the infections by *Enterococcus*, *Rev. Clin. Esp.*, **203(10)**: 482-485.

GÓMEZ-ESTACA, J., *et. al.*, (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, **112**: 18-25.

GONI, P., *et. al.*, (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, **116(4)**: 982-989.

GÜLÇİN, I., (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**: 213-220.

GÜLÇİN, I., (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86**: 345-391.

GULLUCE, M. *et. al.*, (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. *ssp. longifolia*. *Food Chemistry*, **103(4)**:1449-1456.

GYAWALI, R. & IBRAHIM, S. A., (2012). Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95(1)**: 29-45.

HACEK, D. M., DRESSEL, D. C. & PETERSON, L. R., (1999). Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. **37(6)**: pp 1881.

HALIWELL, B. & CHIRICO, S., (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**: 7155- 7245.

HALLIWEL, B. & GUTTERIDGE, J., (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford Science Publication*, 3rd Ed.

HALLIWELL, B., (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism., *Biochemical Pharmacology*, **49(10)**: 1341-1348.

HALLIWELL, B., (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141**: 312-322.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J. & ARUOMA, O. I., (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33(7)**: 601-617.

HAMDY, M., ATEF-SARHAN, M., SELIM, K. & IBRAHIM, K., (2012). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, **43**: 827-831.

HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A., (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55(6)**: 481-504.

HARMAN, D., (1986). Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. John E. Johnson Jr et al (Edt) Alan R. Liss, Inc. New-York: 3 - 49.

HARRISON, F. E. & MAY, J. M., (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, **46(6)**: 719-730.

HAUNG, D., OU, B. & PRIOR, R., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Chemistry*, **53**: 1841-1856.

HAYEK, S. A., GYAWALI, R. & IBRAHIM, S. A., (2013). Antimicrobial natural products. In A. Méndez-Vilas (Ed.). *Formatex Research Center*, **2**: 910-921.

HAYEK, S. & IBRAHIM, S., (2012). Antimicrobial activity of Xoconostle pears (*Opuntiamatudae*) against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium. *International Journal of Microbiology*, **2012**:1-6.

HENÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E., PONCE-ALQUICIRA, E. & JARAMILLO-FLORES, M., 2008. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, **81**: 410-417.

HOLLEY, R. A. & PATEL, D., (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, **22(4)**: 273-292.

HOSEIN, A. M., BREIDT, F. & SMITH, C. E., (2011). Modeling the effects of sodium chloride, acetic acid, and intracellular pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **77(3)**: 889-895.

HOSSAIN, M. A., et. al., (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Biomedicine*, **3(9)**: 705-710.

HUR, S. J., LIM, B. O., DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J., (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125(1)**: 1-12.

IBRAHIM, S. A., BOR, T., SONG, D. & TAJKARIMI, M., (2011). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157: H7 in pomegranate carrot and pomegranate-apple blend juices. *Food and Nutrition*, **2**: 844-851.

INDU, M. N., et. al., 2006. Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **37(2)**: 153-158.

JONES, P., (2002). Clinical nutrition: 7. Functional foods more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, **166(12)**: 1555-1563.

JUSTESEN, U. & KNUTHSEN, P., (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, **73**: 245-250.

JUVEN, B. J., KANNER, J., SCHVED, F. & WEISSLOWICZ, H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, **76(6)**: 626-631.

KALANTZI, L., *et. al.*, (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, **23(1)**: 165-176.

KARAKAYA, S., (2004). Bioavailability of phenolic compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44(6)**: 453-464.

KERR, K. & SNELLING, A., (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, **73(4)**: 338-344.

KIM, T. J., *et. al.*, (2008). Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Protection*, **71(7)**: 1465-1468.

KLAUNIG, J., WANG, Z., PU, X. & ZHOU, S., (2001). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Vol. **254(2)**: 86-99.

KOHEN, R. & NYSKA, A., (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**: 620-650.

KOŞAR, M., GÖGER, F. & BAŞER, K. H. C., (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 2369-2374.

KRIS-ETHERTON, P. M., *et. al.*, (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, **113 (suppl)**: 71-88.

KRIS-ETHERTON, P. M., *et. al.*, (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, **24**: 511-538.

KUSKOSKI, E. M., *et. al.*, (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Food Science and Technology*, **25(4)**: 726-732.

LAFAY, S. & GIL-IZQUIERDO, A., (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, **7(2)**: 301-311.

LAGOS LA ROSA, E., (2012). Determinación de la Actividad Antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de la gingivitis. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman-Tacna Facultad de Ciencias de la Salud: 26-31.

LAI, P. K. & ROY, J., (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, **11(11)**: 1451-1460.

LARKIN, T., PRICE, W. E. & ASTHEIMER, L., (2008). The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **48(6)**: 538-552.

LAUPLAND, K., *et. al.*, (2002). Population-based assessment of intensive care unit-acquired bloodstream infections in adults: Incidence, risk factors, and associated mortality rate. *Critical Care Medicine*, **30**: 2462-2467.

LEWIS, K. & AUSUBEL, F. M., (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, **24(12)**: 1504-1507.

LICINA, B. Z., *et. al.*, (2013). Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*, **33**: 498-504.

LIMÓN-PACHECO, J. & GONSEBATT, M., (2009). The role of antioxidants and antioxidants-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674(1)**: 137-147.

LIU, R. H., (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78(3 suppl)**: 517S-520S.

LIU, R. H., (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanisms of action. *The Journal of Nutrition*, **134(12 suppl)**: 3479S-3485S.

LOARCA-PINA, G. & GONZALEZ DE MEJIA, E., (2004). Oregano: Properties, composition and biological activity. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, **54(1)**: 31-38.

LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. & ALZAMORA, S., (2005). Naturally occurring compounds - plant sources, In: *Antimicrobials in food*. Taylor & Francis Group: 428-451.

LOURDES, B., GARCIA, L., ROJO, D. & ZANCHEZ, E., (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, **20**: 231-235.

LOWY, F., (1998). *Staphylococcus aureus* infection. *New England Journal of Medicine*, Mass Medical Soc., **339**: 520-532.

MADSEN, H. & BERTELSEN, G., (1995). Spices as antioxidants. *Trends Food Science Technology*, **6**: 271-277.

MAGALHÃES, L., SEGUNDO, M., REIS, S. & LIMA, J., (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613(1)**: 1-19.

MASELLA, R., *et. al.*, (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **16(10)**: 577-586.

MATA, A. T., *et. al.*, (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of Five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, **102(3)**: 778-786.

MATSUKAWA, R., *et. al.*, (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal. of Applied Phycol.*, **9**: 29-35.

MATSUMOTO, R., (2008). Actividade antioxidante de chá mate (*Ilex paraguariensis*). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brasil.

MAU, J. L., CHEN, C. H. & HSEIH, P. C., (2002). The antimicrobial effect of Chinese chive. *Food Science and Agricultural Chemistry*, **4**: 95-103.

MBATA, T., L., D. & SAIKIA, A., (2006). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea. *International Journal of Microbiology*, **7(19)**: 1571.

MERCADO, G., *et. al.*, (2012). Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in México.

MESSINA, M., HO, S. & ALEKEL, D. L., (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **7(6)**: 649-658.

MESSINA, M., KUCUK, O. & LAMPE, J. W., (2006). An overview of the health effects of isoflavones with an emphasis on prostate cancer risk and prostate-specific antigen levels. *Journal of AOAC International*, **89(4)**: 1121-1134.

MICELLI, N., *et. al.*, (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis pall.* from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 6570-6577.

MILOS, M., MASTELIC, J. & JERKOVIC, I., (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, **71**: 79-83.

MINEKUS, M., *et. al.*, (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*, **5(6)**: 1113-1124.

MOON, J. & SHIBAMOTO, T., (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57**: 1655-1666.

MOSTAFA, A., *et. al.*, 2017. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.

NAKAMURA, S., KATO, A. & KOBAYAAHIT, K., (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 2033-2037.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1998). Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico: 7.18-7.21

National Committee for Clinical Laboratory Standards, V. P., (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. ISBN 1-55581-347-X.

NESTEL, P., (2003). Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Current Opinion in Lipidology*, **14(1)**: 3-8.

NIMALARATNE, L. A., (2015). Antioxidants in Chicken Egg Yolk: Effects of Cooking, Storage and Gastrointestinal Digestion. Edmonton: University of Alberta.

O'GARA, J. & HUMPHREYS, H., (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications, Review article. *Journal of Medical Microbiology*, **50**: 582-587.

OLASUPO, N., FITZGERALD, D., NARBAD, A. & GASSON, M., (2004). Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *Journal of Food Protection*, **67(3)**: 596-600.

OLGUIN, G., MELÉNDEZ, G., ZUÑIGA, A. & PASQUETTI, A., (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, **4**: 199-206.

PARKINSON, A., (1996). Biotransformation of xenobiotics. in: Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J., New-York, EUA: Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5ª Edição, McGraw-Hill Companies: 113-186.

PASCUAL, M., *et. al.*, (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 201-214.

PEREIRA, O., *et. al.*, (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International*, **54**: 1773-1780.

PEREZ TORTOSA, V., (2008). Proyecto de investigación de los Antioxidantes del Tomillo. Repositorio.upct.es - Cartagena - España.

PERUMALLA, A. V. S. & HETTIARACHCHY, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts—potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, **44(4)**: 827-839.

POIROUX-GONORD, F., *et. al.*, (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 12065-12082.

POPOVA, M., *et. al.*, (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, **15(4)**: 235-240.

PORFIRIO, S., *et. al.*, (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, **122(1)**: 179-187.

PRIOR, R. L., WU, X. & SCHAICH, K., 2005. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements.*, s.l.: Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53(10)**: 4290-302.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R., *et. al.*, (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, **90(4)**: 494-507.

RAMFUL, D., *et. al.*, (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of *Mauritian citrus* fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**: 75-87.

RAMIREZ, L. & MARIN-CASTAÑO, D., (2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica XV*, n. **42**, ISSN 0122-1701: 264.

RECORD, I. & LANE, J., (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas, *Food Chemistry*, **73(4)**: 481-486.

REIN, M. J., *et. al.*, (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **75(3)**: 588-602.

RE, R., *et. al.*, (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **26(9-10)**: 1231-1237.

RIBEIRO, M., (2016). Influência do processo digestivo na atividade antioxidante de alimentos funcionais. Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, Portugal. 29-43.

RICE-EVANS, C., MILLER, N. & PAGANGA, G., (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **2(4)**: 304-309.

RICE-EVANS, C., MILLER, N. & PAPANGA, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20(7)**: 933-956.

RICKE, S. C., 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, **82(4)**: 632-639.

RIVAS, A., COLIN-BARENQUE, L., DORADO-MARTINEZ, C. & FORTOUL, T., (2001). Estrés oxidativo y neurodegeneración en temas selectos de neurociencias II. UNAM . PUIS.

ROBERFROID, M., (1999). Concepts in Functional foods: the case of inulin and oligofructose.. *Journal of Nutrition*, **129**: 1398 -1401.

ROBSON, M., 2002. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça fresca tipo toscana. Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense: 23- 29.

ROSS, J. A. & KASUM, C. M., (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, **22(1)**: 19-34.

ROYER, M., DIOUF, P. & STEVANOVIC, T., (2011). Polyphenols content and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food and Chemical Toxicology*, **49(9)**: 2180-2188.

RUBY, M. V., *et. al.*, (1999). Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, **33**: 3697.

SAHIN, F., *et. al.*, (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, **15**: 549-557.

SALGADO, C., FARR, B. & CALFEE, D., (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.*, **36**: 131-139.

SANCHEZ, E., GARCIA, S. & HEREDIA, N., (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **76(20)**: 6888-6894.

SARKAR, F. H. & LI, Y., (2003). Soy Isoflavones and Cancer Prevention. *Cancer Investigation*, **21(5)**: 744-757.

SCALBERT, A., MORAND, C., MANACH, C. & REMESY, C., (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **56(6)**: 276-282.

SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G., (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, **130(8 suppl.)**: 2073S-2085S.

SCHELMMER, U., (1995). Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *Br. J. Nutr.*, **73**: 150-151.

SCHÜMANN, K., ELSENHANS, B., GORDON, D. & SCHLEMMER, U., (1994). Bioavailability '93: different aspects of 'bioavailability' in perspective. *Br. J. Nutr.*, **72**: 950-952.

SEIFRED, H., ANDERSON, D., FISHER, I. E. & MILNER, J., (2007). A review of interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **18(9)**: 567-579.

SERAFINI, M., (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, **34(12)**: 533-535.

SHAN, B., CAI, Y.-Z., BROOKS, J. D. & CORKE, H., (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117(1)**: 112-119.

SHAN, B., CAI, Y. Z., SUN, M. & CORKE, H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 7749-7759.

SHIMAMURA, T., ZHAO, W. H. & HU, Z. Q., (2007). Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry*, **6(1)**: 57-62.

SIES, H., 1993. Strategies of antioxidant defence: Review. *European Journal of Biochemistry*, **215(2)**: 213-219.

SIES, H. & STAHL, W., (1995). Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62(6)**: 1315-1321.

SILVA-MATIOLLI, L., (2014). Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares. Universidade Estadual Paulista: 32-38.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In P. Lester (Ed.). Academic Press, *Methods in Enzymology*, **299**: 152-178.

SIRACUSA, L., *et. al*, (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to

a two-step *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59(23)**: 12553-12459.

ŠKERGET, M., *et. al.*, (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Control*, **15**: 549-557.

SORG, O., (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, *Comptes Rendus Biologies*, **327(7)**: 649-662.

SPIRIDON, I., BODIRLAU, R. & TEACA, C., (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*, **6**: 388-396.

STAHL, W., VAN DEN BERG, H., *et. al.*, (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, **23**: 39-100.

STRATEVA, T. & YORDANOV, D., (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, **58(9)**: 1133-1148.

SUBTIL, E., MIERZWA, J. & HESPANHOL, I., (2009). Avaliação do desempenho do sistema UV/H₂O₂ no tratamento de efluentes provenientes do processo de tratamento térmico de emulsões de água e óleo. *Revista Ambiente e Água*, **4(3)**: 169-180.

TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., BERTOLINI, D. & CONTE, A., (2010). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, **120(2)**: 599-606 ref.30.

TAJKARIMI, M. M., IBRAHIM, S. A. & CLIVER, D. O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21(9)**: 1199-1218.

TEPE, B., DAFERERA, D., SÖKMEN, M. & POLISSIOU, M., (2004). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(5)**: 1132-1137.

TIWARI, B. K., *et. al.*, (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57(14)**: 5987-6000.

TODAR, K., (2008). The New Microbial World. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. Todar's online textbook of bacteriology. www.textbookofbacteriology.net/staph.html, consultado em Março de 2017.

TONGUINO, M., (2011). Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de dos plantas aromáticas: Menta (*Mentha piperita* L) y Orégano (*Origanum vulgare* L). Universidad Técnica del Norte, Ecuador: 25-50.

TREVASKIS, N. L., CHARMAN, W. N. & PORTER, C. J. H., (2008). Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update. *Advanced drug delivery reviews*, **60(6)**: 702-716.

TUTIN, T. HEYWOOD, V. H. BURGESS, N. A., MOORE, D.M., *et. al.*, (1972). Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge: Cambridge University Press.

VALDÉS, B., TALAVERA, S. & FERNANDEZ-GALIANO, E., (1987). Flora Vascular de Andalucía Occidental. Ketres Editora, Barcelona - España, ISBN 8485256662.

VALENTÃO, P., *et. al.*, (2001). Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 3476-3479.

VALGAS, C., SOUZA, S. M. D., SMÂNIA, E. F. A. & JR, A. S., (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**: 369.

VALKO, M., *et. al.*, (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39(1)**: 44-84.

VAN CAMPEN, D. & GLAHN, R., (1999). Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crop. Res.*, **60**: 93-113.

VILLANO, D., FERNANDEZ-PACHON, M., MOYA, M. & TRONCOSO, A. G. M., (2007). Radical scavenging ability of poly-phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, **71(1)**: 230-235.

WALLACE, R. J., (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *The Nutrition Society*, Cambridge University Press, **63(4)**: 621-629.

WATZKE, H., (1998). Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends Food Science Technology*, **9**: 320.

WEERAKKODY, N. S., CAFFIN, N., TURNER, M. S. & DYKES, G. A., (2010). *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, **21(10)**: 1408-1414.

WEICHSELBAUM, E. & BUTTRISS, J. L., (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, **35(2)**: 157-164.

WIENK, K. J. H., MARX, J. J. M. & BEYNEN, A. C., (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, **38(2)**: 51-75.

WILCOX, J. K., ASH, S. L. & CATIGNANI, G., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **44(4)**: 275-295.

WOOD, R. J., (2005). Bioavailability: definition, general aspects and fortificants. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2nd Ed. Caballero Prentice, A., Allen, L. (Ed.),

YOUNGSON, R., (2003). Antioxidantes y Radicales Libres., Editorial Edaf, S.A, Madrid – España: 10-177.

ZÁCARI, C., (2008). Estabilidade oxidativa de óleo extra-virgem de castanhas do Pará com ervas aromáticas antioxidantes. Teses.usp.br Universidade de São Paulo.

ZAICA, L. L., (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, **9(2)**: 97-118.

ZAICA, L. L. & KISSINGER, J. C., (1984). Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *Journal of Food Science*, **49(1)**: 5-9

ZHENG, W. & WANG, S., (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**: 5165-5170.